

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR Dr. E. BUCHBORN

ISOLIERUNG VON CORTICOSTEROID-BINDENDEN
GLOBULIN (CBG)
CHARAKTERISIERUNG UND RADIOIMMUNOLOGISCHE
BESTIMMUNG IM SERUM *

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von

Cornelia Bernutz
aus München

1978

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. C. Scriba
PD Dr. med. K. Horn
Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.1979



Meinen Eltern

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. P. C. Scriba und
Herrn PD Dr. med. K. Horn für die
Förderung und Unterstützung, die mir
bei dieser Arbeit zuteil wurden,

Frau PD Dr. med. C. R. Pickardt für
ihren unermüdlichen Einsatz und ihre
stetigen Anregungen,

Frau F. Haag für die zuvorkommende Be-
handlung meiner Wünsche bezüglich der
Abbildungen,

Herrn L. Bestler für die Beratung bei
der Anfertigung der technischen Zeich-
nungen,

Frau Th. Kubiczek sowie den übrigen
Angestellten für die angenehme Zusammen-
arbeit.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551927_0006

	<u>Seite</u>
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>METHODIK</u>	4
2.1. Material	4
2.1.1. Gele	4
2.1.2. Reagenzien	4
2.1.3. Verwendete Geräte	7
2.2. Methoden	8
2.2.1. Cortisol-Radioimmunoassay	8
2.2.2. Indirekter CBG-Nachweis	9
2.2.2.1. Prinzip	9
2.2.2.2. Durchführung des ^3H -Cortisol-Uptake Tests	9
2.2.2.3. Cortisol in-vitro-Test mit Florisil	10
2.2.3. Isolierung von CBG	11
2.2.3.1. Affinitätschromatographie	11
2.2.3.1.1. Prinzip	11
2.2.3.1.2. Herstellung der Cortisol-Sephrose	14
2.2.3.2. Anionenaustauschchromatographie	15
2.2.3.2.1. Prinzip	15
2.2.3.2.2. Präparation der Säule	15
2.2.3.3. Affinitätschromatographie auf Con A-Sephrose	16
2.2.3.3.1. Prinzip	16
2.2.3.3.2. Präparation der Säule	16
2.2.3.4. Adsorptionschromatographie auf Hydroxylapatit	16
2.2.3.4.1. Prinzip	16
2.2.3.4.2. Präparation der Säule	17

	<u>Seite</u>
2.2.3.5.	Dialysieren und Einengen 17
2.2.3.6.	Gefriertrocknen 18
2.2.4.	Methoden zum Reinheitsnachweis und zur Charakterisierung des isolierten CBG 19
2.2.4.1.	Disc-Elektrophorese 19
2.2.4.1.1.	Prinzip 19
2.2.4.1.2.	Durchführung 21
2.2.4.2.	SDS-Elektrophorese 24
2.2.4.2.1.	Prinzip 24
2.2.4.2.2.	Durchführung 25
2.2.4.3.	Isoelectric focusing 26
2.2.4.3.1.	Prinzip des Isoelectric focusing 26
2.2.4.3.2.	Durchführung 26
2.2.4.4.	Immunelektrophorese 28
2.2.4.4.1.	Prinzip 28
2.2.4.4.2.	Durchführung 29
2.2.4.5.	Ouchterlony-Doppeldiffusions-Test 29
2.2.4.5.1.	Prinzip 29
2.2.4.5.2.	Durchführung 29
2.2.4.6.	Ultrazentrifugation 30
2.2.4.6.1.	Sedimentationsgeschwindigkeits- lauf 30
2.2.4.6.2.	Gleichgewichtslauf 30
2.2.4.7.	Untersuchung der Cortisol-Bindung am isolierten CBG mit Hilfe des Scatchard Plots 31
2.2.4.7.1.	Prinzip des Scatchard Plots 31
2.2.4.7.2.	Allgemeine Probleme der Bound- Free-Trennung 32
2.2.4.7.3.	Bound-Free-Trennung durch Gelfiltration 33

	<u>Seite</u>
2.2.4.7.4. Durchführung des Scatchard-Plots	34
2.2.4.8. Quantitative Aminosäureanalyse	35
2.2.4.9. Qualitative Bestimmung des Zuckeranteils im CBG	36
2.2.5. Radioimmunoassay für CBG	38
2.2.5.1. Prinzip des Radioimmunoassays	38
2.2.5.2. Antikörpergewinnung	39
2.2.5.2.1. Auswahl der Kaninchen	39
2.2.5.2.2. Herstellung der Injektionslösung	39
2.2.5.2.3. Applikation	39
2.2.5.2.4. Boostern	40
2.2.5.2.5. Blutentnahme	40
2.2.5.2.6. Austestung des Antikörpers	40
2.2.5.3. Radioaktive Markierung des CBG	40
2.2.5.3.1. Markierungsablauf	40
2.2.5.3.2. Abtrennung des markierten Proteins vom freien ^{125}Jod	41
2.2.5.4. Testansatz und Fällung des Antikörpers	42
2.2.5.5. Kalibrierstandardkurve	44
2.2.5.5.1. Erstellung einer Kalibrierstandardkurve	44
2.2.5.5.2. Auswertung der Eichkurve	45
2.3. Praktische Durchführung der Präparation des CBG	45
2.3.1. Anreicherungs-schritt über Affinitätschromatographie	46
2.3.1.1. Extraktion des CBG aus Humanplasma	46
2.3.1.2. Elution des CBG von der Cortisol-Sepharose	46

	<u>Seite</u>
2.3.2. Weitere chromatographische Reinigung des CBG	47
2.3.2.1. QAE-Sephadex A-50 mit Stufen- gradientenelution	47
2.3.2.2. Con A-Sepharose	48
2.3.2.3. Hydroxylapatit (HTP)	48
2.3.2.4. QAE-Sephadex A-50 mit kontinuier- lichem NaCl-Gradienten	49
<u>3. ERGEBNISSE</u>	50
3.1. Ergebnisse zur Präparation des CBG	50
3.1.1. Affinitätschromatographie	50
3.1.2. QAE-Sephadex A-50 mit Stufengradient	51
3.1.3. Con A-Sepharose	53
3.1.4. Hydroxylapatit (HTP)	55
3.1.5. QAE-Sephadex A-50 mit kontinuier- lichem NaCl-Gradienten	57
3.2. Ergebnisse zu den Reinheitskrite- rien und zur Charakterisierung	59
3.2.1. Disc-Elektrophorese	59
3.2.2. SDS-Elektrophorese	62
3.2.3. Isoelectric focusing	63
3.2.4. Immunelektrophorese	64
3.2.5. Ouchterlony-Doppeldiffusions-Test	64
3.2.6. Ultrazentrifugation	65
3.2.7. Scatchard-Plot	68
3.2.8. Quantitative Aminosäureanalyse und Bestimmung des Zuckeranteils des CBG	69

	<u>Seite</u>
3.3.	Ergebnisse zum Radioimmunoassay 71
3.3.1.	Ergebnisse zur Austestung des Antikörpers 71
3.3.2.	Ergebnisse zur Markierung des CBG 74
3.3.2.1.	Berechnung der spezifischen Aktivität des Tracers 74
3.3.2.2.	Nachreinigung des CBG-Tracers 75
3.3.3.	Ergebnisse zur Erstellung einer Kalibrierstandardskurve 76
3.3.3.1.	Ermittlung der für den Assay optimalen Antikörper-Verdünnung 76
3.3.3.2.	Qualitätskontrolle des Radioimmunoassays 78
3.3.3.2.1.	Präzision 78
3.3.3.2.2.	Richtigkeit 78
3.3.3.3.	Immunoelektrophoretischer Ausschluß einer Kreuzreaktion des Antikörpers mit anderen Serumproteinen 80
3.3.3.4.	Ausschluß einer Kreuzreaktion des CBG-Antiserums mit TBG 81
3.3.3.5.	Einfluß des Cortisols auf den Radioimmunoassay 81
3.4.	Klinische Ergebnisse 82
3.4.1.	Normalbereich 82
3.4.1.1.	Altersabhängigkeit und Geschlechtsunterschiede 82
3.4.2.	Abhängigkeit der CBG-Spiegel von endogenen und exogenen Veränderungen der Östrogenspiegel 84
3.4.2.1.	Anstieg der CBG-Spiegel in der Gravidität 84
3.4.2.2.	Östrogentherapie bei Frauen 86
3.4.2.3.	Östrogentherapie bei Männern 89

	<u>Seite</u>
3.4.2.4. Zyklusabhängigkeit der CBG-Spiegel	91
3.4.2.5. CBG-Spiegel während der Behandlung mit dem "Antigonadotropin" Danazol	93
3.4.3. Einfluß von primär veränderten Cortisol-Spiegeln auf das CBG	95
3.4.4. CBG-Spiegel bei erniedrigtem TBG	96
3.4.4.1. Genetisch bedingter TBG-Mangel	96
3.4.4.2. Symptomatisch bedingter TBG-Mangel	96
3.4.4.3. CBG- und TBG-Spiegel unter Nulldiät	98
<u>4. DISKUSSION</u>	99
4.1. Methode	99
4.2. Klinik	106
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	109
<u>6. LITERATURVERZEICHNIS</u>	113

1. EINLEITUNG

Vor mehr als 20 Jahren entdeckte DAUGHADAY anhand der elektrophoretischen Auftrennung von Serum, das mit radioaktivem Cortisol inkubiert war, daß Cortisol sowohl von Albumin gebunden wird, als auch von einem Protein, das im Bereich der α_1 -Globuline wandert (17). Mit der Äquilibriumsdialyse konnte dann BUSH zwei unterschiedliche Bindungsproteine für Cortisol im Serum nachweisen, eines, das eine hohe Kapazität, aber nur eine niedrige Affinität zum Cortisol aufweist, nämlich das Albumin, das andere mit hoher Affinität und geringer Kapazität. Dieses Protein wurde Corticosteroid-bindendes Globulin (CBG) genannt. Unabhängig von DAUGHADAY und BUSH entdeckte SLAUNWHITE (62) dieses spezifisch Cortisol bindende Protein, das er als Transcortin bezeichnete. Heute werden beide Begriffe synonym verwendet.

Die niedrige Konzentration im Serum und die begrenzte Stabilität des CBG machten seine Isolierung schwierig. Erst 1961 gelang es SEAL und DOE (59), 1966 SLAUNWHITE (63) und MULDOON und WESTPHAL (42) das Protein rein darzustellen, und zwar unter Verwendung der Chromatographien über DEAE-Cellulose und Hydroxylapatit. Ein wesentlicher Fortschritt bei der Isolierung von CBG gelang ROSNER (51) durch die Einführung der Affinitätschromatographie, durch die es möglich war, CBG aus einer großen Menge Plasma in einem kleinen Volumen anzureichern.

Mit der Gewinnung größerer Mengen an CBG konnten dann erste Untersuchungen zu den physikalischen und biochemischen Eigenschaften dieses Proteins durchgeführt werden, wie Molekulargewichtsbestimmung, Sedimentationskoeffizient, Aminosäure- und Zuckeranalyse und Bindungskonstanten für verschiedene Steroidhormone. Mit diesen Fortschritten ging jedoch nicht die Kenntnis über die eigentliche Funktion des CBG einher. Die genaue physiologische Bedeutung dieses Proteins, das mehr als 90 % des im Serum vorhandenen Cortisols bindet, ist noch offen. Lange Zeit schrieb man dem CBG eine alleinige Puffer- und Reservoirfunktion zu, unter der Annahme, daß nur das freie Cortisol biologisch aktiv sei. Man weiß jedoch bisher kaum etwas darüber, auf welche Art das Cortisol an die Rezeptorproteine in Zytosol und Kern der betreffenden Zellen gelangt. Erleichtert das Trägerprotein die Aufnahme des Cortisols in die Zelle, indem es an einem spezifischen Ort der Zelloberfläche reagiert? Oder kann das Protein eventuell selbst die Zellmembran passieren und so als Transportprotein den Transport des Cortisols in die Zelle gewährleisten? Alle diese Möglichkeiten blieben weiterhin jedoch nur Spekulationen und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Die Voraussetzung zu Untersuchungen auf dem Gebiet der biologischen und klinisch-diagnostischen Bedeutung des CBG im Serum ist jedoch eine spezifische Bestimmungsmethode, deren Aufbau das Ziel dieser Arbeit ist.

Bisher gelang der Nachweis des CBG nur durch indirekte Methoden, die auf der Bestimmung der maximalen Bindungskapazität für Cortisol beruhten. Alle diese Verfahren sind störanfällig durch die mögliche Interferenz mit Albumin und endogenen Steroidhormonen und durch die Veränderung des Äquilibriums während der Analyse, was auch durch die stark differierenden Angaben der CBG-Spiegel im Normalserum zum Ausdruck gebracht wird.

Neuerdings wird die spezifische Messung der CBG-Spiegel im Serum mit Hilfe der Immundiffusion durchgeführt, eine Methode, die sehr zeit- und arbeitsintensiv ist, so daß die Bestimmung von größeren Probenmengen nicht praktikabel ist.

Zur quantitativen Bestimmung von CBG bevorzugten wir den Radioimmunoassay, der aufgrund seiner hohen Spezifität und guten Praktikabilität den anderen Verfahren weit überlegen ist.

2. METHODIK

2.1. Material

2.1.1. Gele

Folgende Gele und Austauscher wurden von der Firma Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden, bezogen: AH-Sepharose 4B, ein Trägergel, an das Cortisol-Hemisuccinat für die Affinitätschromatographie kovalent gekoppelt wurde,

QAE-Sephadex A-50 als Anionenaustauscher,

Con A-Sepharose für Affinitätschromatographie von Glycoproteinen und die Dextrangele G-10 und G-50 zur Bound-Free-Trennung.

Das Calciumphosphatgel Hydroxylapatit Bio Gel HTP: Firma Bio-Rad Laboratories, Richmond, California.

Florisil, ein Magnesiumtrisilikat-Gel, als Adsorbens für freies Cortisol: Firma Serva, Feinbiochemica, Heidelberg.

2.1.2. Reagenzien

³H-Cortisol-Tracer wurde von The Radiochemical Centre, Amersham, England, über die Firma Buchler, Braunschweig, bezogen.

1 mCi/ml wurde zuerst in 20 ml absoluten Äthanol gelöst und dann mit Aqua bidest auf 500 ml weiter verdünnt. Die spezifische Aktivität betrug 110 mCi/mg.

"Stabiles" Cortisol: Firma Merck, Darmstadt

Hydrocortisone - 21 Sodium Succinate (= Cortisol-Hemisuccinat): Firma Sigma, Chemical Company, St. Louis, Mo. USA.

Cortisol-Antikörper-Lösung: 1:2000 verdünntes
Cortisol-Antiserum; P. Vezce, Heidelberg.
N-Äthyl-N-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimid:
Firma Merck-Schuchardt

α -Methyl-D-Mannosid: Firma Roth KG, Karlsruhe.
Humanplasma wurde als Poolserum unter Zusatz von
Acid-citrate-dextrose (ACD) hergestellt und frisch
von der Blutbank bezogen und sofort aufgearbeitet.
Die zum radioaktiven Nachweis für ^3H -Cortisol be-
nötigten Substanzen wie Insta-Gel als Scintilla-
tionsgemisch und die entsprechenden Gefäße wurden
von Packard Instruments, Frankfurt, bezogen.

Flüssigkeitsscintillationsspectrometrie:
Die zu messenden Proben mit ^3H -Cortisol-Tracer
wurden in Packard-Gefäße pipettiert, mit 10 ml Insta-
Gel versetzt und anschließend gut durchgeschüttelt.
Vor der Messung wurden die Proben bei 4°C ca. 1/2 Std.
gekühlt.

Die Messung erfolgt im β -Zählgerät der Firma Packard
als Flüssigkeitsscintillationsspectrometrie.

Folgende Reagenzien zur Disc-Elektrophorese wurden
von der Firma Serva, Feinbiochemica, Heidelberg, be-
zogen:

Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis),
N,N,N',N' tetramethyläthylendiamin (TEMED)
Ammoniumpersulfat (PER)
Coomassie Brilliant Blue R 250, Silikonlösung
Lauryl Sulfate (SDS-Sodium Dodecyl Sulfate) von der
Firma Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.USA
Bromphenolblau, Diäthylbarbitursäure, Mercaptoäthanol
und Saccharose von der Firma Merck Darmstadt.

Ampholine^R pH 3,5 - 5,0 zum Isoelectric focusing
LKB Produkter, Bromma, Schweden.

Die Referenzsubstanzen Human-Transferrin von den
Behringwerken AG, Marburg, und
Rinderalbumin (Albumin pulv. Fraktion V Bovine)
Firma Roth KG, Karlsruhe.

Für den Radioimmunoassay verwendete Reagenzien:
Zum Immunisieren benötigten wir Freund'sches Ad-
juvans komplett der Firma Merck, Darmstadt, Tuber-
culin GT 100 und Pertussis-Impfstoff der Behring-
werke AG, Marburg.

Die zur Markierung des CBG verwendeten Substanzen
wie Chloramin T, Natrium-metabisulfit und Kalium-
jodid wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezo-
gen.
Natrium-¹²⁵Jodid: Firma Hoechst AG, Frankfurt.
Rinderalbumin: Firma Roth KG, Karlsruhe.

Folgende Lösungen wurden zur Markierung verwendet:

- a) Puffer A: 0,2 g Rinderalbumin in 100 ml 0,05 M
Natriumphosphatpuffer pH 7,4
- b) Puffer B: 4,2 g Rinderalbumin in 100 ml 0,05 M
Natriumphosphatpuffer pH 7,4
- c) Puffer C: 0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5
- d) 5 mCi ¹²⁵Jod in 100 µl Puffer C
- e) 30 mg Chloramin-T in 10 ml Puffer C
- f) 30 mg Natrium-metabisulfit in 10 ml Puffer C
- g) 100 mg Kaliumjodid in 10 ml Puffer C

Die Lösungen e) und f) dürfen erst kurz vor dem Markierungsvorgang hergestellt werden.

Puffer A wird nicht nur zur Markierung, sondern allgemein zur Verdünnung von Antikörper- und Standardlösungen etc. verwendet.

Für den Testansatz wurden verwendet:

Polyäthylenglycol: Firma Merck-Schuchardt

γ -Globulin aus Rinderserum: Firma Serva, Feinbiochemica, Heidelberg.

Als 2. Antikörper wurde Anti-Rabbit Precipiting Serum (donkey) von der Firma Wellcome Reagents Ltd. verwendet (Wellcome Research Laboratories Beckenham, England).

Alle übrigen benutzten Präparate, die allgemein zur Herstellung von Puffern dienten, waren p.a.-Präparate der Firma Merck, Darmstadt.

2.1.3. Verwendete Geräte

Bei unseren Versuchen wurden folgende Geräte verwendet:

Liquid Scintillation Spectrometer Tri-Carb.:

Firma Packard Instruments, Frankfurt.

Gamma-Guard: Firma Tracerlab, Köln.

Dies ist ein 3-Kanal-Gamma-Zähler mit einem Bohrlochkristall.

Proportionierpumpe: Firma Ismatec, Zürich, Schweiz.

pH-Meter: pH Digi 510, Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim.

Fraktionssammler: Radi Rac, LKB Produkter, Bromma, Schweden.

Von LKB wurden ebenfalls die Apparatur zur Disc-Elektrophorese und das entsprechende Netzgerät (LKB 2103 Power Supply) verwendet.

Gefriertrockner: Firma Leybold-Heraeus GT2.

Beckman analytische Ultrazentrifuge

Kollodiumhülsen SM 13200 und dazugehörige Einengapparatur von der Firma Sartorius-Membranfilter-GmbH, Göttingen.

2.2. Methoden

2.2.1. Cortisol-Radioimmunoassay

Die Bestimmung des Gesamt-Cortisols im Serum erfolgte durch einen Radioimmunoassay (31), der nach folgendem Prinzip durchgeführt wurde:

Nach Inkubation von 100 μ l verdünnter Serumprobe mit 50 μ l ^3H -Cortisol-Tracer wird das Cortisol auf 5 ml Sephadex G-10-Säulchen in saurem Milieu quantitativ aus dem Serum extrahiert und adsorbiert. Nach einem Umpufferungsschritt wird durch Nachwaschen mit der Cortisol-Antikörper-Lösung der an den Antikörper gebundene Anteil des ^3H -Cortisols eluiert und zur Messung der Radioaktivität gesammelt. Anschließend wird der freie Anteil des ^3H -Cortisols mit Cortisol-freiem Nachwaschserum eluiert. Der Normalbereich liegt bei $95 \pm 40 \mu\text{g/l}$.

2.2.2. Indirekter CBG-Nachweis

2.2.2.1. Prinzip

Nach Inkubation einer Serumprobe mit ^3H -Cortisol-Tracer wird die Verteilung des Tracers zwischen bindenden Proteinen und zugegebenen Adsorbentien, z. B. Sephadex G-50 oder Florisil, bestimmt. Bei hohem Gehalt der Probe an spezifisch bindenden Proteinen wird relativ wenig Cortisol, umgekehrt bei niedrigem CBG-Gehalt viel Cortisol an dem Adsorbens festgehalten. Nachteile dieser Methoden sind, daß dieser Nachweis für das CBG unempfindlich und in erheblichem Maße abhängig von dem Cortisolgehalt der Probe, vom Probenvolumen und von der Temperatur ist.

2.2.2.2. Durchführung des ^3H -Cortisol-Uptake Tests

Nach Inkubation von 200 μl Serum mit 200 μl Cortisol-Tracer wird über eine 5 ml Sephadex G-50-Säule eine Auftrennung von proteingebundenem und freiem Cortisol durchgeführt.

Der Normalbereich des sog. freien ^3H -Cortisols hängt wesentlich von den experimentellen Bedingungen (Sephadexmenge, Temperatur) ab. Er liegt bei uns zwischen 18 und 30 % (11, 31).

2.2.2.3. Cortisol in-vitro-Test
 mit Florisil

Bevor das CBG isoliert und ein Radioimmunoassay aufgebaut worden war, konnte der Nachweis für dieses Protein während der einzelnen Präparierschritte nur indirekt durch den Cortisol in-vitro-Test erbracht werden.

Aus praktischen Erwägungen wurde der unter 2.2.2.2. beschriebene Test wie folgt modifiziert:

100 µl Serum bzw. Probe wurden mit 100 µl ^3H -Cortisol 15 min bei 4°C in einem Eppendorfgesäß inkubiert und dann mit 500 µl Florisilsuspension (1 g Florisil in 10 ml 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4) 3 min geschüttelt. Das Florisil wurde abzentrifugiert und 500 µl des Überstandes in ein Packardgefäß pipettiert. Es wurde somit die Radioaktivität des proteingebundenen Anteils gemessen.

2.2.3. Isolierung von CBG

Das CBG liegt im Serum in äußerst kleinen Mengen, im Mittel von nur rund 3 - 4 mg/100 ml vor (50, 66, 71), was einem Anteil an allen Serumproteinen von ca. 0,05 % entspricht.

Als erster wesentlicher Schritt zur Isolierung von CBG aus Humanplasma wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt, durch die eine spezifische Extraktion von CBG aus einem großen Plasmavolumen und somit eine deutliche Anreicherung erreicht wurde. Weitere Säulenchromatographien über Anionenaustauscher, Con A-Sepharose und Hydroxylapatit dienten der weiteren Reinigung des CBG.

2.2.3.1. Affinitätschromatographie

2.2.3.1.1. Prinzip

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht darauf, daß an ein Trägergel eine Substanz gekoppelt wird, die eine hohe Affinität, z.B. für ein aus dem Serum zu extrahierendes Protein besitzt. Dieses wird spezifisch gebunden, während andere Proteine nicht, oder nur unspezifisch, absorbiert werden.

Zur Präparation des CBG wurde als Trägergel die AH-Sepharose 4B verwendet, bei der über eine "6 carbon spacer group" freie Aminogruppen herausragen. An diese können Moleküle mit Carboxylgruppen kovalent gekoppelt werden. Da das Cortisol, das die höchste Affinität zum CBG aufweist, diese Gruppen nicht be-

sitzt, muß es vor einer Kopplung erst mit Carboxylgruppen substituiert werden.

Eine Möglichkeit ist die Herstellung des Cortisol-3-(o-carboxymethyl)oxims, das dadurch entsteht, daß Carboxymethylhydroxylamin mit der Ketogruppe am 3.C-Atom ein Oxim bildet (72).

Eine weitere Möglichkeit bietet sich in der Verwendung des Cortisol-21-Hemisuccinates (51), bei dem am C-21-Atom Bernsteinsäure angelagert wird.

Durch diese beiden Reaktionen besitzt das Cortisol jeweils eine freie Carboxylgruppe, ohne daß seine Bindungsfähigkeit für das CBG beeinträchtigt wäre (43).

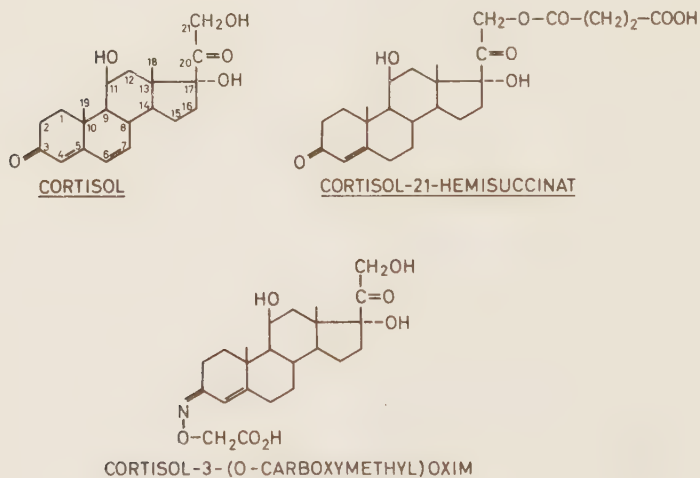


Abb. 1 Strukturformeln des Cortisols, Cortisol-21-Hemisuccinates und des Cortisol-3-(o-Carboxymethyl)oxims

Zur Präparation der Cortisol-Sephrose wurde Cortisol-Hemisuccinat verwendet, dessen Carboxylgruppe mit der Aminogruppe der AH-Sephrose 4B unter H_2O -Abspaltung eine Peptidbindung einging. Das Carbodiimid, das beide Gruppen aktivierte, war ein Harnstoffanhydrit, das durch H_2O -Aufnahme zum Harnstoff wurde (13).

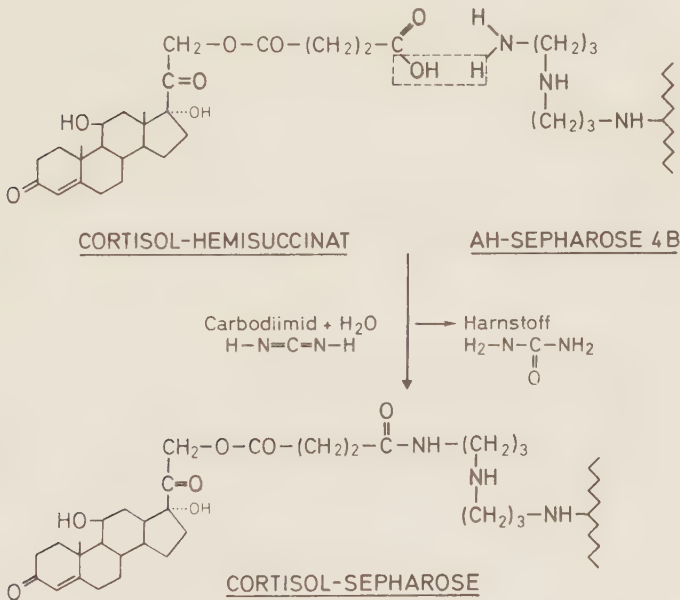


Abb. 2 Prinzip der Kopplung von Cortisol-Hemisuccinat an AH-Sepharose 4B nach der Carbodiimid-Methode

2.2.3.1.2. Herstellung der Cortisol-Sepharose

Die Kopplung des Cortisols in Form des Cortisol-Hemisuccinates an AH-Sepharose 4B wurde in Anlehnung an die von CUATRECASAS 1970 beschriebene Methode mit wasserlöslichem N-Äthyl-N-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimid-hydrochlorid durchgeführt (16).

5 g AH-Sepharose 4B ($\hat{=}$ 0,16 mMol Aminogruppen) wurden in einem Überschuß an 0,5 M NaCl-Lösung eine halbe Stunde lang gequollen (1 g $\hat{=}$ 4 ml), daraufhin über eine Fritte mit 1000 ml 0,5 M NaCl zur Entfernung von Lactose und Dextran und mit 500 ml Aqua bidest gewaschen. 1 g Cortisol-Hemisuccinat ($\hat{=}$ 2 mMol) wurde in 50 ml Dimethylformamid vollständig in Lösung gebracht, anschließend wurden 60 ml Aqua bidest zugegeben, so daß die endgültige Dimethylformamid-Konzentration weniger als 50 % betrug.

Die feuchte Sepharose wurde direkt in die Cortisol-Hemisuccinat-Lösung gegeben, und der pH-Wert mit 1 N HCl auf 4,7 eingestellt. 1,1 g Carbodiimid ($\hat{=}$ 5 mMol) wurden in 5 ml Aqua bidest gelöst und tropfenweise zur Cortisol-Sepharose-Suspension gegeben, die dann 20 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt wurde.

Anschließend wurde die Cortisol-Sepharose über eine Fritte abgegossen und die überschüssigen Reaktionssubstanzen mit 1000 ml 50 %iger Dimethylformamid-Lösung entfernt. Danach wurde 10 mal alternierend mit 1000 ml einer 1 M Glycin-Lösung zur Inaktivierung freier Bindungsstellen und mit 1000 ml 0,2 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,6 gespült. Zum Schluß wurde die Cortisol-Sepharose mit Aqua bidest gewaschen.

2.2.3.2. Anionenaustauschchromatographie

2.2.3.2.1. Prinzip

Als Anionenaustauschergel wurde QAE-Sephadex A-50 verwendet, das aus einer Matrix (Sephadex G-50) besteht, an die positiv geladene Ionen (-Diäthyl-(2 hydroxypropyl)-aminoäthyl) chemisch gebunden sind, sowie aus freibeweglichen, negativ geladenen Gegenionen. Diese Gegenionen lassen sich durch Ionen gleicher Ladung austauschen. Trägt man auf die Säule ein Protein auf, das im alkalischen Puffer zum größten Teil negativ geladen ist, wird es die Gegenionen des QAE-Sephadex A-50 austauschen und retiniert werden. Erst durch eine höhere Konzentration an Anionen im Elutionspuffer wird das Protein wieder verdrängt.

Da sich die Proteine in ihrem Ladungszustand, d.h. in ihrer Dissoziationskonstanten (pK-Wert) unterscheiden, werden sie mehr oder weniger stark auf der Säule retiniert und somit bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen voneinander getrennt eluiert.

2.2.3.2.2. Präparation der Säule

Das über 24 Stunden in 0,18 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,6 gequollene Gel wurde unter Vermeidung von Luftblasen in die entsprechenden Glas-säulen gepackt und die vollständige Sedimentation abgewartet. Anschließend wurde die Säule mit 2 Säulenvolumina des Startpuffers äquilibriert.

2.2.3.3. Affinitätschromatographie auf Con A-Sepharose

2.2.3.3.1. Prinzip

Die Chromatographie über Con A-Sepharose ist eine für Glycoproteine spezifische Affinitätschromatographie. Bei diesem Gel ist Concanavalin A mit Hilfe der Bromcyan-Methode an AH-Sepharose 4B gekoppelt worden. Concanavalin A besitzt eine hohe Affinität zu Glucose und Mannose, welche im Zuckeranteil eines Glycoproteins, wie dem CBG, reichlich vorhanden sind. In Anwesenheit von Mg-, Mn- und Ca-Ionen und in einem pH-Bereich von 7,4 werden die Glycoproteine an Concanavalin adsorbiert und erst durch eine hohe Konzentration von α -Methyl-D-Mannosid wieder verdrängt und eluiert.

2.2.3.3.2. Präparation der Säule

Con A-Sepharose lag bereits in gequelltem Zustand vor und wurde nach dem Einfüllen in die Säule mit 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 vorgespült.

2.2.3.4. Adsorptionschromatographie auf Hydroxylapatit

2.2.3.4.1. Prinzip

Hydroxylapatit (HTP) ist ein Calciumphosphat-Gel, das das CBG im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinen nicht adsorbiert.

Wie von verschiedenen Autoren beschrieben, ist diese Chromatographie sehr spezifisch für das CBG (42, 50, 51, 59, 63, 66, 71) und stellt den effektivsten Reinigungsschritt dar.

2.2.3.4.2. Präparation der Säule

Das Bio Gel HTP wurde ca. 15 min in 0,001 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 gequollen, der Überstand mit den Bestandteilen, die nicht sedimentierten, dekantiert, und das Gel erneut aufgeschlemmt. Diese Prozedur wurde noch einmal wiederholt. Ebenso wie bei der Anionenaustauschchromatographie wurde die Säule, bevor das Protein aufgetragen wurde, mit dem Startpuffer äquilibriert.

2.2.3.5. Dialysieren und Einengen

Die Reduzierung der Eluate während der Präparation des CBG wird durch Unterdruck in einer Kollodiumhülle vorgenommen.

Die Kollodiumhülle ist eine semipermeable Membran, die für kleine Ionen, wie z.B. Salze, durchlässig ist, nicht jedoch für Proteine.

Die Kollodiumhülle wird auf die Ausflußöffnung eines Trichters gesteckt, der luftdicht durch einen Gummiringverschluß auf eine Saugflasche aufgesetzt wird, die mit Aqua bidest gefüllt ist. Nachdem der Trichter mit der Proteinlösung gefüllt worden ist, wird durch Anschließen des Gefäßes an eine Wasserstrahlpumpe ein Unterdruck erzeugt, durch den das überschüssige Wasser und Salze abgesaugt werden, während Proteine innerhalb der Membran bleiben.

Durch dreimaliges Wasserwechseln in der Saugflasche und Nachspülen des Trichters mit Aqua bidest läßt sich eine salzfreie Proteinlösung gewinnen. Sobald die Lösung auf ca. 1 ml eingengt worden ist, wird die Wasserstrahlpumpe abgeschaltet. 1 Stunde lang läßt man das Aqua bidest aus der Saugflasche in die Kollodiumhülse zurückdiffundieren, damit die Proteine, die an der Membran adsorbieren, wieder in Lösung gehen. Anschließend kann die eingengte Flüssigkeit herauspipettiert werden.

2.2.3.6. Gefriertrocknen

Die salzfreie Proteinlösung wird bei -20° C zuerst tiefgefroren und dann im Lyophilisator unter Hochvakuum gebracht; das Eis sublimiert und der entweichende Wasserdampf wird durch eine Pumpe, unterstützt durch einen Tiefkühlkondensor, so schnell entfernt, daß infolge der Verdunstungskälte das zu trocknende Protein im gefrorenen Zustand bleibt.

2.2.4. Methoden zum Reinheitsnachweis und zur Charakterisierung des isolierten CBG

2.2.4.1. Disc-Elektrophorese

Die Disc-Elektrophorese dient als äußerst empfindlicher Reinheitsnachweis einer Substanz und übertrifft die herkömmlichen chromatographischen und elektrophoretischen Auftrennungstechniken für Proteine (41).

2.2.4.1.1. Prinzip

Polyacrylamid ist das Polymerisationsprodukt des Monomers Acrylamid $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ und des Comonomers N,N'-methylen-bis-acrylamid(Bis) $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH} = \text{CH}_2$. Die Konzentrationen dieser beiden Substanzen bestimmen Dichte, Viskosität und Porengröße des Gels. N,N,N',N' tetramethyläthyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (PER) katalysieren den Polymerisationsvorgang.

Die aufzutrennende Probe wird zuerst in einem großporigen Sammelgel konzentriert und darauf in einem kleinporigen Trenngel aufgetrennt (27, 41, 74). Die starke Konzentrierung der Proteine im Sammelgel, die eine Voraussetzung für eine scharfe Auftrennung ist, wird durch einen diskontinuierlichen pH- bzw. Spannungsgradienten erreicht. Der pH-Gradient entsteht durch die Wahl verschiedener pH-Werte in beiden Gelen, der Spannungsgradient durch die unterschiedliche Porengröße.

Bei der Disc-Elektrophorese findet die Auftrennung der Proteine sowohl nach Ladung, als auch nach Molekular-

gewicht statt, da das Polyacrylamid aktiv an dem Auftrennungsprozeß teilnimmt. Es reagiert nämlich mit den wandernden Partikeln und zwar umso stärker, je größer ein Protein ist.

Theoretisch besteht die Möglichkeit, daß ein großes Protein mit einer hohen Ladung und ein kleines Protein mit einer niedrigen Ladung vollkommen identisch wandern. Das Vorhandensein einer Bande bei einer bestimmten Gelkonzentration darf daher noch nicht als Homogenität eines Proteins aufgefaßt werden.

Als eindeutiges Reinheitskriterium gilt nur eine homogene Bande in mindestens 3 Gelkonzentrationen und 2 verschiedenen Puffersystemen. Die aufgetrennten Proteine werden durch Anfärben sichtbar gemacht.

2.2.4.1.2. Durchführung

Die Disc-Elektrophorese wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von MAURER durchgeführt (41).

Tab. 1 Herstellung der Stammlösungen und Mischungsverhältnis der Gele für das Gelsystem pH 8,9 (nach MAURER (41))

Trenngel 7,5 % T		Sammelgel	
Lös. 1	30 g Acrylamid 0,8 g Bis	Lös. 4	12 g Acrylamid 0,4 g Bis
Lös. 2	36,3 g Tris (pH 8,9) 0,23 ml TEMED 48 ml 1 N HCl	Lös. 5	5,7 g Tris (pH 6,7) 0,46 ml TEMED mit o-Phosphor- säure auf pH 6,7
Lös. 3	0,14 g PER	Lös. 6	0,2 g PER
ad 100 ml Aqua bidest			

Mischungsverhältnis:

2 Teile	Lös. 1	2 Teile	Lös. 4
1 Teil	Lös. 2	1 Teil	Lös. 5
1 Teil	Aqua bidest	1 Teil	Aqua bidest
4 Teile	Lös. 3	4 Teile	Lös. 6

Elektrodenpuffer: Stammlösung: 6 g Tris
28,8 g Glycin
ad 1000 ml Aqua bidest
≈ pH 8,3

Gebrauchspuffer: Stammlösung: wird 1:10 verdünnt

Probenpuffer: 0,05 M Tris-Phosphat pH 6,7
+ 20 % Saccharose

Werden andere Gelkonzentrationen verwendet, so muß Lösung 1 entsprechend konzentrierter bzw. verdünnter angesetzt werden.

Tab. 2 Herstellung der Stammlösungen
und Mischungsverhältnis der Gele
für das Gelsystem pH 7,5 (nach MAURER (41))

Trenngel 7,5 % T		Sammelgel	
Lös. 1 und 3 wie bei Gel-system pH 8,9		Lös. 4 und 6 wie bei Gel-system pH 8,9	
Lös. 7 (pH 7,5)	6,85 g Tris	Lös. 8	4,95 g Tris
	0,46 ml TEMED		0,46 ml TEMED
	48 ml 1 N HCl		39 ml o-Phosphor-säure

ad 100 ml Aqua bidest

Mischungsverhältnis:

2 Teile	Lös. 1	2 Teile	Lös. 4
1 Teil	Lös. 7	1 Teil	Lös. 8
1 Teil	Aqua bidest	1 Teil	Aqua bidest
4 Teile	Lös. 3	4 Teile	Lös. 6

Elektrodenpuffer: 5,52 g Diäthylbarbitursäure
1 g Tris
ad 1000 ml Aqua bidest
pH 7,0

Probenpuffer: 0,05 M Tris-Phosphat pH 5,5
+ 20 % Saccharose

Präparation der Gele

In dem in Tab. 1 und 2 angegebenen Verhältnis wurden zuerst die Lösungen des Trenngels gemischt und in ein silikonisiertes Glasröhrchen (10 x 0,6 cm) bis zu einer Höhe von 7,5 cm gefüllt. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde es mit dem Sammelgel überschichtet.

Auftragen der aufzutrennenden Probe

20 µg CBG wurden in 20 µl Aqua bidest gelöst, mit dem gleichen Volumen an Probenpuffer vermischt und direkt auf das Sammelgel, das mit Elektrodenpuffer bedeckt ist, aufgetragen. Durch die hochprozentige Saccharose-Konzentration im Probenpuffer vermischte sich das Protein nicht mit dem Elektrodenpuffer und blieb als schmale Bande auf dem Sammelgel liegen.

Elektrophoretische Auftrennung

Die Elektrophoresekammer wurde mit kaltem Elektrodenpuffer gefüllt, der obere Teil der Kammer wurde mit den Röhrchen aufgesetzt und ebenfalls mit Puffer gefüllt. Die Kabel wurden so an ein Netzgerät angeschlossen, daß der Strom von oben (Kathode) nach unten (Anode) floß. Für jedes Röhrchen wurde eine Stromstärke von 6 mA eingestellt.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter Kühlung und zwar so lange, bis die Front - gekennzeichnet durch Bromphenolblau, das dem Probenpuffer

in einer Konzentration von 1 % zugefügt werden kann - am unteren Rand des Röhrchens erschien.

Färben des Gels

Nach Abschalten des Stromes wurde das Gel aus dem Röhrchen herausgelöst und 4 Stunden in folgende Färbelösung gelegt:

0,25 % Coomassie-Blau in	5 Teilen Methanol
	1 Teil Eisessig
	1 Teil Aqua bidest

Entfärben des Gels

Das Entfärben des Gels erfolgte in dem beschriebenen Lösungsmittel für Coomassie-Blau.

2.2.4.2. SDS-Elektrophorese

Während die Disc-Elektrophorese Proteine sowohl nach ihrer Ladung als auch nach ihrem Molekulargewicht auftrennt, wandern Substanzen in der SDS-Elektrophorese nur nach ihrem Molekulargewicht.

2.2.4.2.1. Prinzip

SDS (Sodium dodecyl sulfat) ist ein Detergenz, dessen Dodecylsulfat-Anion mit Proteinen einen Komplex bildet, so daß sie nur mehr als Anionen wandern (41). Die Zugabe von Mercaptoäthanol im Inkubationsgemisch bewirkt die Sprengung der Disulfidbrücken, wodurch

einerseits die Polymerisation mehrerer Moleküle verhindert wird, andererseits intramolekulare Banden gelöst werden, so daß sich das Protein auffaltet (74).

Die SDS-Elektrophorese wird nach demselben Prinzip und mit denselben Gelkonzentrationen durchgeführt wie die unter 2.2.4.1. beschriebene Disc-Elektrophorese. Der einzige Unterschied besteht in der Zugabe von SDS im Sammel- und Trenngel sowie im Elektrodenpuffer und in der Inkubation der Probe mit SDS und Mercaptoäthanol vor dem Auftragen.

2.2.4.2.2. Durchführung

Herstellung der Stammlösungen:

Die SDS-Elektrophorese wurde im Gelsystem pH 8,9 bei den Polyacrylamid-Konzentrationen von 10, 7,5 und 5 % durchgeführt.

Sowohl dem Trenngel als auch dem Sammelgel wurde vor dem Polymerisieren nach einer Vorschrift von ZÄHLER (74) zu 0,1 % SDS beigemischt. Die gleiche SDS-Konzentration befand sich im Elektrodenpuffer.

Vorbereitung der Probe:

20 µg CBG wurden in 20 µl Aqua bidest gelöst und mit 20 µl einer 2%igen SDS und 2 %igen Mercaptoäthanol-Lösung 3 Stunden lang bei 37° C inkubiert (41) und dann aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung, das Färben und Entfärben erfolgten wie bei der Disc-Elektrophorese (vgl. 2.2.4.1.).

2.2.4.3. Isoelectric focusing

Eine viel empfindlichere Methode, die Homogenität eines Proteins zu prüfen als Ionenaustauschchromatographie und elektrophoretische Verfahren bietet sich in der Durchführung eines Isoelectric focusing. Mit dieser Technik ist es möglich, Substanzen nach ihrem isoelektrischen Punkt aufzutrennen.

2.2.4.3.1. Prinzip des Isoelectric focusing

Durch einen pH-Gradienten, der mit Hilfe von Ampholyten in einem Polyacrylamidgel aufgebaut wird, wandern Proteine zu ihrem isoelektrischen Punkt, wo sie fokussieren, d.h. als scharfe Bande liegen bleiben.

Aufgetrennte Proteine werden durch Anfärben sichtbar gemacht.

2.2.4.3.2. Durchführung

Das Isoelectric focusing wurde nach einer Vorschrift von MRA (Medical Research Apparaters) durchgeführt.

Tab. 3 Herstellung der Stammlösungen
und Mischungsverhältnis der Gele

Lösung 1 20 g Acrylamid
 0,8 g Bis
 ad 100 ml Aqua bidest

Lösung 2 200 mg PER ad 10 ml Aqua bidest

Mischungsverhältnis für ein 5,06 %iges Gel

4 ml Aqua bidest
1,5 ml Lösung 1
1 Tropfen TEMED
0,32 ml Ampholine^R (pH 5,0 - 3,5)
0,09 ml Lösung 2

Anodenlösung: 0,01 M H_3PO_4

Kathodenlösung: 0,01 M NaOH

Elektrophoretische Auftrennung

Nachdem die Gelmischung in Plastikröhrchen gefüllt und polymerisiert war, wurden diese in die Elektrophoresekammer gesetzt, die unten mit der Anodenlösung und oben mit der Kathodenlösung gefüllt war.

Zur Errichtung des pH-Gradienten wurde ein Vorlauf von 15 min bei einer Stromstärke von 1 mA/Röhrchen unter Kühlung durchgeführt.

Der Probenansatz, bestehend aus 40 µg Protein in 40 µl Aqua bidest und 5 µl Ampholine^R wurde aufgetragen und bei 500 V aufgetrennt.

Anfärben des Gels

Da sich mit Coomassie-Blau, das bei der Disc-Elektrophorese verwendet wurde, nicht nur Proteine, sondern auch die Ampholyte anfärben, wurde das Gel in folgende Bromphenolblau-Lösung gelegt:

0,2 % BPB in 50 % Äthanol
5 % Eisessig
45 % Aqua bidest

Entfärben

Entfärbelösung: 30 % Äthanol
5 % Eisessig
65 % Aqua bidest

Das Entfärben dauert durchschnittlich 24 Stunden.

2.2.4.4. Immunelektrophorese*

2.2.4.4.1. Prinzip

In einem Agargelfilm, der auf eine Glasplatte aufgebracht worden ist, werden die zu untersuchenden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Aus einem ausgestanzten Kanal im Agarfilm läßt man dann das Antiserum diffundieren.

Es entstehen als Ausdruck einer Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbare Präzipitationslinien.

* Ich danke Herrn PD Dr.med. A. FATEH-MOGHADAM, Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern, für die Durchführung dieser Untersuchungen.

2.2.4.4.2. Durchführung

Eine 7 %ige CBG-Lösung und ein Normalserum werden zuerst elektrophoretisch aufgetrennt. Danach läßt man das CBG-Antiserum gegen die Proteine diffundieren.

2.2.4.5. Ouchterlony-Doppeldiffusions-Test

2.2.4.5.1. Prinzip

In einem Agargelfilm werden Löcher ausgestanzt, die so angeordnet sind, daß sich um ein Zentralloch für das Antiserum alle weiteren Löcher kreisförmig gruppieren, in die die zu untersuchenden Proteinlösungen aufgetragen werden. Die Substanzen läßt man gegeneinander diffundieren. An der Stelle, an der eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattfindet, ist eine Präzipitationslinie erkennbar.

2.2.4.5.2. Durchführung

Im Zentralloch wurde das CBG-Antiserum aufgetragen, um dieses herum Normalserum, CBG-Lösung, Humanalbumin, α_1 -Antitrypsin, α_2 -Haptoglobin und α_2 -Makroglobulin.

2.2.4.6. Ultrazentrifugation*

2.2.4.6.1. Sedimentationsgeschwindigkeitslauf

Zur Überprüfung der Homogenität des CBG wurde zuerst ein Sedimentationsgeschwindigkeitslauf bei 56 000 UpM und bei 29,9° C durchgeführt. Bei diesem Lauf wird photometrisch die Geschwindigkeit beobachtet, mit der sich ein Protein vom Meniskus der Zelle zu ihrem Boden bewegt, woraus der Sedimentationskoeffizient zu errechnen ist.

Zu Beginn des Versuches ist das CBG, das in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 gelöst ist, homogen in der Zelle verteilt. Je länger die Zentrifugation dauert, umso kleiner wird die Konzentration im Bereich des Meniskus und umso mehr steigt sie am Boden der Zelle an, bis sich das Protein dort ganz niederschlägt.

Wären in der zu untersuchenden Substanz außer dem CBG andere niedermolekulare Proteine, so würden diese langsamer sedimentieren, und man könnte im Sedimentationsdiagramm 2 Komponenten erkennen.

2.2.4.6.2. Gleichgewichtslauf

Der Gleichgewichtslauf zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde bei 34 000 UpM und bei 22,4° C durchgeführt. Bei dieser Umdrehungszahl sedimen-

※

Ich danke Herrn PD Dr.rer.nat.Helmut KOLB, Forschergruppe Diabetes, Städtisches Krankenhaus Schwabing, für die Durchführung dieser Untersuchungen.

tiert das CBG, das in 3 verschiedenen Konzentrationen in eine Mehrfachsektorzelle gefüllt worden ist, nicht so stark und bleibt in Lösung. Aus der Verteilungskurve, die wiederum mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt wird, läßt sich das Molekulargewicht errechnen. Das partielle spezifische Volumen wird anhand der Aminosäure- und Kohlehydratzusammensetzung bestimmt. Aus Molekulargewicht, Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten errechnet sich der Stokes Radius, der ein Maß für die Größe des Moleküls ist, und der Quotient des Reibungskoeffizienten, der eine Aussage über die Form des Moleküls zuläßt.

2.2.4.7. Untersuchung der Cortisol-Bindung am isolierten CBG mit Hilfe des Scatchard Plots

Als ein besonders wichtiges Reinheitskriterium wird die äquimolare Bindung des Cortisols an das CBG angesehen, wobei 1 Mol CBG 1 Mol Cortisol binden müßte (71). Diese maximale Bindungskapazität wurde mit Hilfe des Scatchard Plots errechnet.

2.2.4.7.1. Prinzip des Scatchard Plots

Zur Berechnung eines Scatchard Plots werden steigende Mengen kalten Cortisol-Standards zu einer bestimmten Menge CBG und Cortisol-Tracer gegeben und nach Inkubation des CBG mit dem Cortisol eine Bound-Free-Trennung durchgeführt, d.h. es wird proteinge-

bundenes Cortisol vom freien abgetrennt. Je größer die Menge an zugegebenem kaltem Cortisol ist, umso höher ist der freie Anteil, der an der Verdrängung des Cortisol-Tracers zu berechnen ist.

Trägt man das Verhältnis von gebundenem zu freiem Cortisol an der Ordinate auf, und die tatsächlich gebundene Cortisol-Menge an der Abszisse, so ergibt sich eine Gerade, wenn die Bindungsstellen äquivalent sind, d.h. wenn das CBG rein ist, mit dem dieser Versuch durchgeführt worden ist.

Aus der Steilheit der Regressionsgeraden ergibt sich die Assoziationskonstante, aus dem Schnittpunkt dieser Geraden mit der Abszisse berechnet sich die maximale Bindungskapazität.

2.2.4.7.2. Allgemeine Probleme der Bound-Free-Trennung

Die grundlegende Forderung der Bestimmung der Cortisol-Bindung am CBG ist die Möglichkeit der Trennung von proteingebundenem und freiem Anteil des Steroids.

Die zu untersuchenden Protein-Steroid-Komplexe werden durch eine nicht kovalente Bindung zusammengehalten, die relativ leicht dissoziiert. Daher befindet sich der CBG-Cortisol-Komplex in einem Zustand des dynamischen Gleichgewichts, in dem er schnell und reversibel dissoziiert.

Folglich muß man eine Methode finden, die das Äquilibrium nicht oder nur minimal stört. Alle bekann-

ten Trennungsmethoden der Bound-Free-Fractionen stören fortwährend das Gleichgewicht, wodurch der Trennungsvorgang von der dauernden Einstellung neuer Gleichgewichte begleitet wird. Beispiele für diese Methoden sind Elektrophorese, Ultrafiltration und Gelfiltration (14, 24, 30, 45, 52, 71). Im Gegensatz dazu bleibt das Gleichgewicht allein bei der Äquilibriumsdialyse bestehen, die aus diesem Grunde am häufigsten für Bindungsstudien verwendet wird. Diese Methode kann allerdings durch Adsorption von Protein und Steroid an der Membran der Dialyseschläuche empfindlich gestört werden.

2.2.4.7.3. Bound-Free-Trennung durch Gelfiltration

Als geeignete, wenig aufwendige Methode, die Assoziationskonstante des CBG zum Cortisol abzuschätzen, fanden wir die Gelfiltration über 1 ml Sephadex G-10-Säulchen. Die Gelfiltration über Sephadex G-10-Säulen beruht auf dem Prinzip des Molekülsiebeffektes, bei dem das freie Steroid in die Poren eindringt und somit zurückgehalten wird. Der proteingebundene Anteil wird ohne Verzögerung (Molekülausschluß) sofort nach dem Totvolumen der Säule eluiert. Das Cortisol wird dem CBG im Überschuß zugegeben, so daß das Protein mit dem Steroid vollständig abgesättigt ist. Läßt man das Inkubationsgemisch über eine Säule wandern, so ist der Protein-Steroid-Komplex durch den "strippenden" Effekt der Sephadex G-10-Säule einer dauernden Dissoziation unterworfen. Die Steroide dissoziieren ab, dringen in das innere Volumen des Geles ein und stehen somit der Bindung nicht mehr

zur Verfügung. Das Protein, das von der Säule eluiert wird, ist nicht mehr vollständig mit dem Steroid abgesättigt, wodurch die errechnete maximale Bindungskapazität kleiner ist als die tatsächliche.

Um diesen "strippenden" Effekt des Geles möglichst gering zu halten, müssen folgende Voraussetzungen erfüllt werden:

- a) Versuchsdurchführung bei 4° C, da bei dieser Temperatur die Assoziationskonstante am größten ist
- b) Inkubation und Elution des Protein-Steroid-Komplexes mit Tris-HCl-Puffer pH 8,0
- c) möglichst kleines Gelvolumen.

2.2.4.7.4. Durchführung des Scatchard-Plots

Präparation der G-10-Säulchen

Sephadex G-10 wurde über Nacht in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 gequellt und dann jeweils 1 ml des Gels in kleine Plastikspritzen gefüllt, deren Ausflußöffnung mit einem Filterpapier verschlossen wurde.

Verwendete Lösungen

100 µg CBG in 100 µl Aqua bidest

0,5 % Rinder γ-Globulin-Lösung zur Verhinderung der Wandadsorption

³H-Cortisol-Tracer: 2 ng Cortisol in 100 µl Tracer

Cortisol-Standard: dieser wurde hochkonzentriert angesetzt, so daß maximal 10 µl zugegeben werden mußten.

Inkubationsansätze

In 8 Eppendorfgefäße wurden jeweils 100 µl der Rinder γ-Globulin-Lösung, 100 µl Cortisol-Tracer und 4 µl CBG-Lösung ($\hat{=}$ 4 g CBG) vorgelegt. Dann wurde in steigender Menge der Cortisol-Standard dazu pipettiert: 0, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 ng. Zur Berechnung der unspezifischen Bindung wurde in ein Eppendorfgefäß nur Rinder γ-Globulin-Lösung und Cortisol-Tracer gegeben.

Das Inkubationsvolumen lag zwischen 204 und 214 µl.

Die Inkubationsansätze wurden 15 min bei 4 ° C zur Einstellung des Äquilibriumms stehengelassen.

Bound-Free-Trennung

Die G-10-Säulchen wurden kurz mit kaltem 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 vorgespült und dann das Inkubationsgemisch aufgetragen. Nachdem dieses eingesunken war, wurde mit 1 ml desselben Puffers nachgespült und das Eluat ($\hat{=}$ 1,2 ml) in einem Packardgefäß aufgefangen und die Radioaktivität des proteingebundenen Anteils gemessen.

2.2.4.8. Quantitative Aminosäureanalyse *

Die quantitative Aminosäureanalyse erfolgte nach saurer Hydrolyse mit dem Aminosäureanalysator Durrum D 500. Das CBG beider Präparationen wurde

* Ich danke Herrn Dr.rer.nat.Edwin FINK, Abt. für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Chirurgischen Klinik, für diese Untersuchungen.

analysiert und der Anteil der einzelnen Aminosäuren am Gesamtmolekül in Mol pro Mol CBG und in g pro 100 g Polypeptid berechnet.

2.2.4.9. Qualitative Bestimmung des Zuckeranteils im CBG*

Die Bestimmung der Monosaccharide erfolgte am Gaschromatographen nach folgender Vorschrift:

Zuerst wurden die Glycoproteine mit 1,5 N MeOH/HCl in abgeschmolzenen evakuierten Ampullen hydrolysiert. 15 - 30 nmol Inhibitor oder Peptid wurden mit 15 - 60 nmol Mannit vermischt und mit 1 ml methanolischer Salzsäure versetzt.

Die Hydrolysetemperatur betrug 95° C.

Nach Beendigung der Reaktion wurden die vorhandenen Aminozucker mit Acetanhydrid N-acetyliert. Eine Spatelspitze AgCO_3 wurde in die methanolische Lösung der Hydrolyseprodukte gegeben, die anschließend mit 0,3 ml Acetanhydrid versetzt wurde. Nach 6 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde vom Silbercarbonat abzentrifugiert, nachgewaschen und die vereinigten Lösungen wurden am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht.

Die Methylglycoside wurden anschließend in die O-Trimethyl-silyläther übergeführt. Die Silylierung erfolgte mit Bis (trimethylsilyl)acetamid für

* Ich danke Herrn Prof. Dr.rer.nat.H. TSCHESCHE, Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität München, für diese Bestimmung.

drei Stunden bei Raumtemperatur.

Die Bestimmung der silylierten Methylglycoside erfolgte am Gaschromatographen. In einer Glassäule von 2 m Länge und 3 mm innerem Durchmesser wurde 5 % Methylsilicon Gummi SE 30 auf Chromosorb W-AW-DM CS, 80 - 100 mesh, als stationäre Phase verwendet. Die Strömungsgeschwindigkeit des Trägergases (Helium) betrug 60 ml/min. Die Temperatur am Einspritzblock betrug 300° C, die des Detektors 320° C. Nach 2 min bei 130° C wurde mit 2°/min auf 190° C aufgeheizt. Dann wurde mit 4°/min bis 250° C erhitzt. Diese Temperatur wurde für 20 min beibehalten. Die Probengröße betrug 1 - 3 µl, in denen ca. 2 nmol der einzelnen Monosaccharide gelöst waren.

Die Identifizierung des Peaks erfolgte nach relativen Retentionszeiten bezogen auf Mannit als internen Standard und durch Vergleich mit einem Gemisch aus Monosacchariden. Jedes Monosaccharid verursacht mehrere Peaks, was auf die verschiedenen Isomeren des Zuckers zurückzuführen ist. Die quantitative Auswertung erfolgte durch Aufsummieren der Peakflächen eines Monosaccharids und Quotientenbildung mit dem Wert für die Fläche der internen Standards. Die Berechnung der Menge an Zucker erfolgte mit Hilfe eines molaren Umrechnungsfaktors, der vorher für jedes einzelne Monosaccharid bestimmt worden war.

2.2.5. Radioimmunoassay für CBG

2.2.5.1. Prinzip des Radioimmunoassays

Der Radioimmunoassay basiert auf der Konkurrenz radioaktiv markierter und unmarkierter Antigene um ihren spezifischen Antikörper. Dieser muß in der durch die Isotopenverdünnung gegebenen Proportion mit markierten und unmarkierten Antigenen abgesättigt sein. Als Ergebnis dieser Konkurrenz nimmt die Radioaktivität des Antigen-Antikörper-Komplexes in gleicher Weise ab, wie die Konzentration der unmarkierten Antigene im Versuchsansatz zunimmt. Für den Aufbau eines Radioimmunoassays für CBG müssen folgende Voraussetzungen erfüllt werden:

- a) Gewinnung eines monospezifischen Antikörpers durch Immunisieren, z. B. von Kaninchen, mit reinem CBG
- b) Herstellung eines Tracers durch Markierung des CBG mit ^{125}Jod
- c) Trennung von freiem und Antikörper-gebundenem Antigen durch Fällung mit Polyäthylenglycol oder mit einem zweiten Antikörper
- d) Erstellung einer Kalibrierstandardkurve.

2.2.5.2. Antikörpergewinnung*

2.2.5.2.1. Auswahl der Kaninchen

Zum Immunisieren wurden 2 Kaninchen (weiße Neuseeländer) ausgesucht, die nicht älter als 3 Monate waren. Das Fell am Rücken wurden vollständig abrasiert.

2.2.5.2.2. Herstellung der Injektionslösung

Für zwei Kaninchen wurden 162 µg CBG abgewogen, in 1 ml isotoner Kochsalzlösung (Tuberculin GT 100) gelöst und mit 1,5 ml komplettem Freund'schen Adjuvans gut vermischt. Diese Emulsion wurde auf 2 Spritzen zu gleichen Volumina verteilt.

2.2.5.2.3. Applikation

Jedem Kaninchen wurde der Inhalt jeweils einer Spritze an ca. 50 Stellen des Rückens intradermal injiziert, womit jedes Tier mit 81 µg CBG immunisiert worden war. Zur Anregung der Antikörper-Produktion wurden 0,5 ml Pertussis-Impfstoff in gleicher Weise gespritzt.

* Ich danke Herrn Mike SOFRONIEW, Anatomisches Institut, für seine Hilfe bei der Immunisierung der Kaninchen.

2.2.5.2.4. Boostern

Die Boosterung erfolgte in Abständen von 3 und 6 Wochen nach dem Immunisieren mit 130 und 115 µg CBG und dann noch einmal nach einer Pause von 7 Monaten mit 120 µg. Die Applikation erfolgte in gleicher Weise und mit den gleichen Substanzen wie unter 2.2.5.2.3. beschrieben.

2.2.5.2.5. Blutentnahme

8 - 10 Tage nach jedem Boostern wurden den Kaninchen ca. 6 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Das Blut wurde abzentrifugiert und das gewonnene Serum bei -20° C eingefroren.

2.2.5.2.6. Austestung des Antikörpers

Das nach jeder der 3 Boosterungen gewonnene Serum wurde mit Puffer A (2.1.2.) so weiterverdünnt, daß Verdünnungsreihen von 1:100 - 1:160 000 erstellt werden konnten. Die verschiedenen Antikörperkonzentrationen wurden in den unter 2.2.5.4. beschriebenen Testansatz eingesetzt.

2.2.5.3. Radioaktive Markierung des CBG

2.2.5.3.1. Markierungsablauf

Die zur Markierung verwendeten Lösungen sind unter 2.1.2. aufgeführt.

10 μ l CBG-Lösung (= 10 μ g CBG) wurden in einem Spitzglas vorgelegt und 10 μ l ^{125}Jod (= 0,5 mCi) dazupipettiert. Unter Schütteln wurde mit 10 μ l Chloramin-T die Reaktion gestartet und nach 5 sec durch Zugabe von 20 μ l Natrium-metabisulfit gestoppt (29).

2.2.5.3.2. Abtrennung des markierten Proteins vom freien ^{125}Jod

Zur Abtrennung des markierten CBG vom freien ^{125}Jod wurde eine Con A-Säule verwendet, deren Volumen 1 ml betrug.

Nachdem das Reaktionsgemisch aus dem Spitzglas mit einer Pasteurpipette auf die Con A-Säule aufgetragen worden war, wurde zuerst mit 50 μ l Kaliumjodid-Lösung und darauf mit 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 nachgespült.

Der Vorlauf, in dem sich das freie ^{125}Jod befand, wurde in Fraktionen von 500 μ l in Eppendorfgefäßen aufgefangen und die Radioaktivität jeder Fraktion im Geigerzähler gemessen. Der Spülvorgang dauerte so lange, bis die Radioaktivität abgesunken war. Anschließend wurde das CBG mit 0,06 M α -Methyl-D-Mannosid in 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 eluiert und ebenfalls in Eppendorfgefäßen aufgefangen, in denen zur Verhinderung der Wandadsorption 50 μ l Puffer B vorgelegt waren.

Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden gepoolt und mit Puffer A auf 15 000 cpm/100 μ l verdünnt.

2.2.5.4. Testansatz und Fällung des Antikörpers

Verwendete Lösungen

Die Rinder γ -Globulin-Lösung (1 g Rinder γ -Globulin in 100 ml 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4) dient als Kopräzipitat, der Antigen-Antikörper-Komplex wird mit Polyäthylenglycol (25 g Polyäthylenglycol in 100 ml 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4) gefällt.

Tab. 4 Testansatz zur Fällung des Antikörpers mit Polyäthylenglycol

100 μ l Puffer A (2.1.2.)

100 μ l Tracer

100 μ l Antikörper (1:3000)

Inkubation im Eppendorf-
gefäß bei Zimmertemperatur
mindestens 8 Stunden

100 μ l Rinder γ -Globulin

500 μ l Polyäthylenglycol (23)

mischen, 2 min in Eppendorftischzentrifuge zentrifugieren, Überstand absaugen, Radioaktivität des Niederschlags messen.

Tab. 5 Testansatz zur Fällung des Antikörpers
nach der Doppelantikörpermethode

100 µl Puffer A (2.1.2.)

100 µl Tracer

100 µl Antikörper (1:3000)

Inkubation wie in Tab. 4

100 µl Kaninchen γ -Globulin $\hat{=}$ 7 µg

100 µl 2.Antikörper (1:30)

1 Stunde inkubieren, 2 min
zentrifugieren, Überstand
absaugen, Radioaktivität zählen

Als 2.Antikörper wurde Anti-Kaninchen- γ -Globulin
vom Esel verwendet.

Tab. 6 Testansatz des "Kurzassays"

20 µl Probe

20 µl Tracer

20 µl Antikörper (1:3000)

Inkubation von 20 min

300 µl Puffer A

100 µl Rinder γ -Globulin-Lösung

500 µl Polyäthylenglycol

Die Radioaktivität messen
wie in Tab. 4 beschrieben

Die Inkubationszeit von 8 Stunden, wie sie im Test-
ansatz in Tab. 4 beschrieben wird, läßt sich auf
20 min verkürzen, wenn man einen semiquantitativen
CBG-Nachweis im "Kurzassay" durchführt.

Der Nachweis von CBG innerhalb von kurzer Zeit ist besonders bei der Präparation in den einzelnen Säuleneluatn wichtig.

2.2.5.5. Kalibrierstandardkurve

Nach Literaturangaben (50, 66, 71) betragen die Werte für das CBG im Serum 3 - 4 mg/100 ml. Die hohe Konzentration dieses Proteins macht eine Verdünnung des Serums vor dem Einsetzen in den Assay unumgänglich, da andernfalls der Antikörper zu konzentriert verwendet werden müßte.

2.2.5.5.1. Erstellung einer Kalibrierstandardkurve

Eingewogenes CBG wurde mit Puffer A (2.1.2.) zur Verhinderung der Wandadsorption auf eine Konzentration von 200 µg % gebracht. Ausgehend von diesem Stockstandard wurde mit dem gleichen Puffer eine Verdünnungsreihe von 200 - 0,78 µg % CBG hergestellt, von der jeweils 100 µl als Doppelwert in den Testansatz gegeben wurden.

Durch die Erstellung von 3 Eichkurven mit den Antikörperverdünnungen 1:16 000, 1:8000 und 1:2000 wurde ausgetestet, bei welcher Antikörper-Verdünnung die Serumwerte im steilsten Bereich der Eichkurve liegen.

2.2.5.5.2. Auswertung der Eichkurve

Die Eichkurve und die Standardabweichungen wurden mit Hilfe eines elektronischen Rechners SIEMENS 404/3 und eines Plotters in einem halblogarithmischen Koordinatensystem aufgezeichnet.

In einem Teil des Programms werden die untere Nachweisgrenze und 50 % Intercept angegeben, in einem weiteren Teil können unbekannte Proteinkonzentrationen an der Eichkurve abgelesen werden.

Die Berechnung erfolgte nach einem FORTRAN-Programm auf Grundlage der Spline Approximation (40).

2.3. Praktische Durchführung der Präparation des CBG

Die Präparierschritte wurden bei 4° C mit sterilen Puffern durchgeführt.

Zur Erstellung der Elutionsprofile der einzelnen Säulenchromatographien wurden die Eluate in einzelnen Fraktionen aufgefangen und die CBG-Konzentrationen im Kurzassay gemessen, da mit dem aus Vorversuchen gewonnenen reinen CBG bereits ein Radioimmunoassay aufgebaut war.

Nach jeder Elution wurden die Fraktionen mit dem höchsten CBG-Anteil gepoolt, etwa 5 ml davon wurden in einer Kollodiumhülse konzentriert und dann in der Disc-Elektrophorese aufgetrennt, um nach jedem Reinigungsschritt die Anreicherung des CBG im Eluat gegenüber den Serumproteinen zu überprüfen.

2.3.1. Anreicherungsschritt über
 Affinitätschromatographie

2.3.1.1. Extraktion des CBG aus Humanplasma

5 g gewaschene Cortisol-Sephrose wurden in feuchtem Zustand mit 1,5 l Humanplasma eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur und eine Stunde im Kühlraum bei 4° C geschüttelt.

Die Assoziation des CBG aus dem Plasma an das Cortisol der Sephrose erfolgte bei ca. 22° C, da bei dieser Temperatur die Assoziationskonstante für das CBG relativ hoch liegt (71).

Die Abkühlung auf 4° C verminderte die Dissoziation, denn die Dissoziationskonstante nimmt mit sinkender Temperatur ab (53).

Sobald die Sephrose sedimentiert war, wurde das Plasma über eine Fritte dekantiert und dann das Gel mit 1000 ml 0,2 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 nachgespült, um unspezifisch gebundene Proteine weitgehend abzulösen.

2.3.1.2. Elution des CBG von der Cortisol-Sephrose

Die gewaschene Sephrose wurde in ca. 50 ml 0,16 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,6 aufgenommen und in eine Glassäule gepackt, die durch einen Wärmemantel auf 30° C temperiert war. Nachdem die Sephrose sedimentiert und ebenfalls auf 30° C erwärmt war, wurde das CBG mit 100 ml 0,16 M NaCl in 0,05 M

Tris-HCl-Puffer pH 8,6 eluiert, dem 20 mg% Cortisol-Hemisuccinat beigefügt waren, welches zur Verdrängung des CBG vom Cortisol der Sepharose diente.

Der Grund für die Verwendung von Cortisol-Hemisuccinat im Elutionspuffer war die Tatsache, daß dieses im Gegensatz zum Cortisol im alkalischen Tris-HCl-Puffer gelöst werden kann. Cortisol selbst löst sich nur in Alkohol und eine Alkohol-Konzentration von rund 5 % im Elutionspuffer könnte möglicherweise zur Denaturierung des CBG und zum Verlust der biologischen Aktivität führen.

Die Verwendung des alkalischen Tris-Puffers pH 8,6 ist durch die Tatsache begründet, daß die Dissoziationskonstante für das CBG bei diesem pH relativ hoch liegt, was zusätzlich die Ablösung des CBG vom Cortisol der Sepharose erleichterte.

2.3.2. Weitere chromatographische Reinigung des CBG

2.3.2.1. QAE-Sephadex A-50 mit Stufengradientenelution

70 ml des CBG-Peaks von der Cortisol-Sepharose-Säule wurden auf eine QAE-Sephadex A-50-Säule (2,8 x 25 cm) eluiert, die mit 0,18 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,6 äquilibriert worden war. Durch Nachspülen mit 70 ml Startpuffer wurden Proteine, die aufgrund ihres Ladungszustandes nicht so stark auf der Säule retiniert werden,

vom CBG abgetrennt. Die Elution des CBG erfolgte durch eine stufenweise Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 0,22 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4.

Die Änderung des pH-Wertes von 8,6 auf 7,4 war im Hinblick auf die folgende Chromatographie über Con A-Sepharose unumgänglich, da im alkalischen pH-Bereich die Glycoproteine nicht so stark an das Concanavalin adsorbiert werden.

2.3.2.2. Con A-Sepharose

Der CBG-Peak von der Anionenaustauschchromatographie wurde auf eine mit Con A-Sepharose gefüllte Säule (1,5 x 12 cm) gepumpt. Diese wurde zur Ablösung aller Proteine, die nicht von Concanavalin adsorbiert werden, mit 20 ml 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 nachgespült; anschließend wurde das CBG mit demselben Puffer eluiert, dem zusätzlich 0,06 M α -Methyl-D-Mannosid beigefügt waren.

2.3.2.3. Hydroxylapatit (HTP)

Nach Konzentrierung und Dialyse gegen Aqua bidest in einer Kollodiumhülse wurde der CBG-Peak in einem Volumen von ca. 4 ml auf eine mit Hydroxylapatit gefüllte Säule aufgetragen (1,2 x 45 cm), die mit 0,001 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 äquilibriert war. Da das CBG vom Hydroxylapatit nicht adsorbiert wird, erfolgte die Elution mit Startpuffer.

2.3.2.4. QAE-Sephadex A-50 mit
kontinuierlichem NaCl-Gradienten

Nachdem das Eluat von der Chromatographie über HTP wiederum dialysiert und konzentriert worden war, wurde die Proteinlösung in einem kleinen Volumen auf die mit 0,19 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,6 äquilibrierte QAE-Sephadex A-50-Säule aufgetragen (1,2 x 45 cm). Daraufhin wurde ein NaCl-Gradient von 0,19 M - 0,24 M NaCl abgeschlossen, dessen Gesamtvolumen 400 ml betrug.

Die Fraktionen mit der höchsten CBG-Konzentration wurden in einer Kollodiumhülse durch mehrfaches Dialysieren gegen Aqua bidest salzfrei gemacht. Zum Schluß wurde die CBG-Lösung tiefgefroren, lyophilisiert und bei -20° C aufbewahrt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Ergebnisse zur Präparation des CBG

3.1.1. Affinitätschromatographie

Die Elution des CBG von der Cortisol-Sephrose erfolgt bereits in den ersten Fraktionen. In der Disc-Elektrophorese zeigt sich eine deutliche Proteinanreicherung im Bereich der α_1 -Globuline und eine starke Verunreinigung im Bereich der γ -Globuline. Im Gegensatz dazu ist der Gehalt des Eluats an Albumin äußerst gering im Vergleich zum Nativserum (Abb.3).

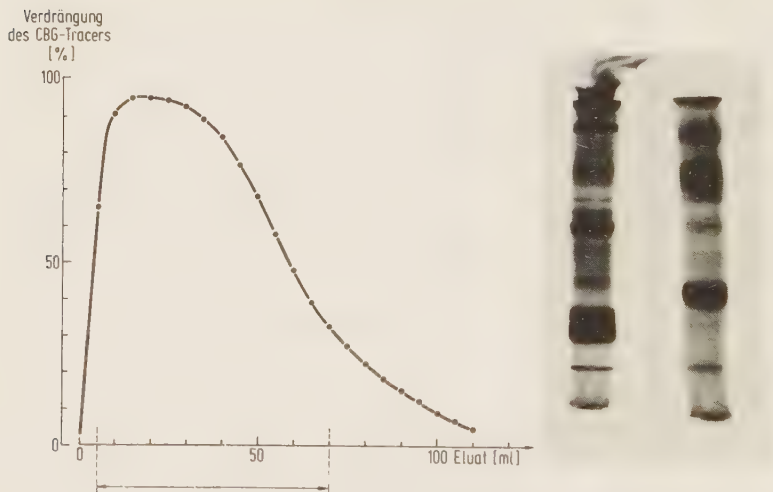


Abb. 3 Elutionsprofil von der Cortisol-Sephrose und Auftrennung von Nativserum und des CBG-Peaks (Pfeil) in der Disc-Elektrophorese

links: Elution des CBG bei 30°C. Die CBG-Konzentrationen wurden in allen folgenden Eluaten (Abb. 3-7) durch den Kurzassay bestimmt.

Pfeil: gepoolte Fraktionen (70 ml)
Säulenmaße: 1,5 x 6 cm

rechts: Auftrennung des Eluates und des Nativserums in der Disc-Elektrophorese, Puffersystem pH 8,9, Gelkonzentration 7,5%.

3.1.2. QAE-Sephadex A-50 mit
Stufengradient

Das Ziel des ersten Reinigungsschrittes über QAE-Sephadex A-50 ist eine weitgehende Abtrennung der γ -Globuline.

Diese wird dadurch erreicht, daß nach dem Auftragen des Protein-Peaks der Affinitätschromatographie mit 70 ml 0,18 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,6 nachgespült wird. Die geringe NaCl-Konzentration bewirkt die Elution der γ -Globuline, während CBG auf der Säule adsorbiert bleibt. Dieses wird durch stufenweise Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 0,22 M in einem scharfen Peak eluiert (Abb. 4).

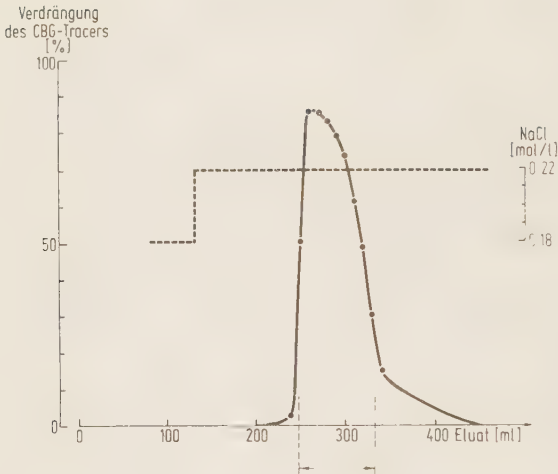


Abb. 4 Elutionsprofil von der QAE-Sephadex A-50-Säule und Auftrennung des CBG-Peaks (Pfeil) in der Disc-Elektrophorese

Links: Elution des CBG von QAE-Sephadex A-50 mit Stufengradient
Pfeil: gepoolte Fraktionen (90 ml)
Säulenmaße: 2,8 x 25 cm

Rechts: Auftrennung des Eluates in der Disc-Elektrophorese

3.1.3. Con A-Sepharose

Zur Entfernung aller Proteine, die von Concanavalin nicht adsorbiert werden, wird nach dem Auftragen des CBG-Peaks mit 20 ml 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 nachgespült. Die Elution des CBG erfolgt daraufhin mit demselben Puffer, dem zusätzlich 0,06 M α -Methyl-D-Mannosid zugefügt sind.

Die Fraktionen mit dem höchsten CBG-Gehalt (= 68 ml) werden gepoolt.

Das Bild der Disc-Elektrophorese zeigt, daß durch diesen Reinigungsschritt eine vollständige Abtrennung der γ -Globuline und Reste des Albumins erzielt werden kann (Abb. 5)

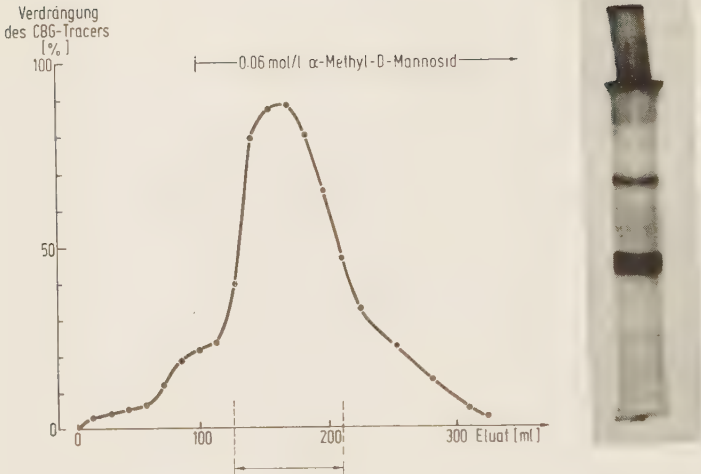


Abb. 5 Elutionsprofil von der Con A-Sepharose-Säule und Auftrennung des CBG-Peaks in der Disc-Elektrophorese

rechts: Elution des CBG von Con A-Sepharose
Pfeil: gepoolte Fraktionen (68 ml)
Säulenmaße: 1,5 x 12 cm

links: Auftrennung des Eluates in der
Disc-Elektrophorese

3.1.4. Hydroxylapatit (HTP)

Mit der Chromatographie über Hydroxylapatit wird eine Abtrennung der α - und β -Globuline erreicht, da dieses Gel äußerst spezifisch für das CBG ist. CBG wird nämlich nicht vom Hydroxylapatit adsorbiert und erscheint sofort nach dem Totvolumen der Säule im Eluat.

Durch Nachwaschen mit einem höher molaren Natriumphosphatpuffer wird kein CBG mehr eluiert, so daß dieses Protein auch unspezifisch nicht adsorbiert wird.

Die Disc-Elektrophorese zeigt außer dem CBG nur noch eine Bande als Verunreinigung im Bereich der β -Globuline (Abb. 6).

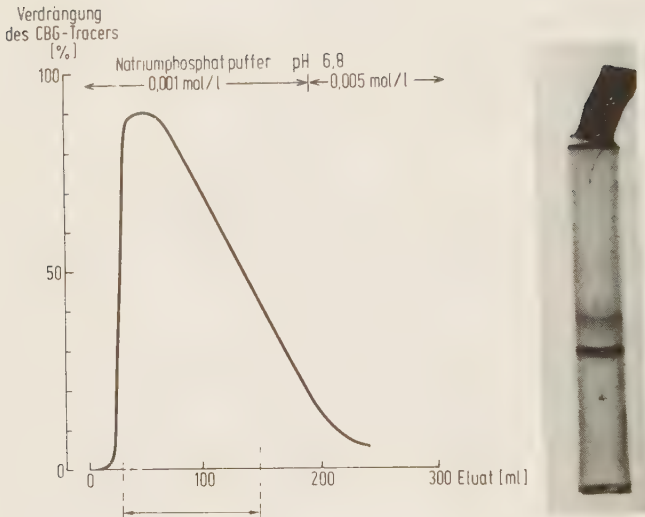


Abb. 6 Elutionsprofil von der Hydroxylapatit-Säule und Auftrennung des CBG-Peaks in der Disc-Elektrophorese

rechts: Elution des CBG vom Hydroxylapatit
Pfeil: gepoolte Fraktionen (120 ml)
Säulenmaße: 1,2 x 45 cm

links: Auftrennung des Eluates in der
Disc-Elektrophorese

3.1.5. QAE-Sephadex A-50 mit
kontinuierlichem NaCl-Gradienten

Die Entfernung der letzten Verunreinigungen wird dadurch erreicht, daß der CBG-Peak der Chromatographie über eine QAE-Sephadex A-50-Säule unterworfen wird, die an einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten von 0,19- 0,24 M NaCl angeschlossen ist.

Das CBG erscheint bei einer NaCl-Konzentration von 0,20 M. Das eluierte CBG wandert in der Disc-Elektrophorese in einer homogenen Bande (Abb. 7).

Die Wiederfinderate über alle Präparierschritte betrug 20 %.

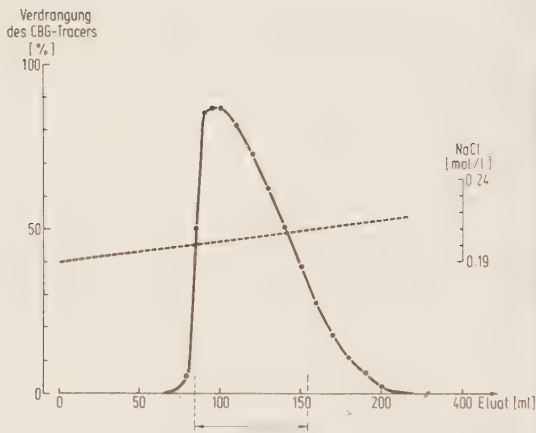


Abb. 7 Elutionsprofil von der QAE-Sephadex A-50 Säule und Auftrennung des CBG-Peaks in der Disc-Elektrophorese

rechts: Elution des CBG von QAE-Sephadex A-50 mit kontinuierlichem NaCl-Gradienten
Pfeil: gepoolte Fraktionen (75 ml)
Säulenmaße: 1,2 x 45 cm

links: Auftrennung des Eluates in der Disc-Elektrophorese

3.2. Ergebnisse zu den Reinheitskriterien
und zur Charakterisierung

3.2.1. Disc-Elektrophorese

Der Reinheitsnachweis für das isolierte CBG wurde zuerst im Puffersystem pH 8,9 durchgeführt. In allen 3 verwendeten Gelkonzentrationen (10, 7,5 und 5 %) zeigte sich jeweils eine homogene Bande.

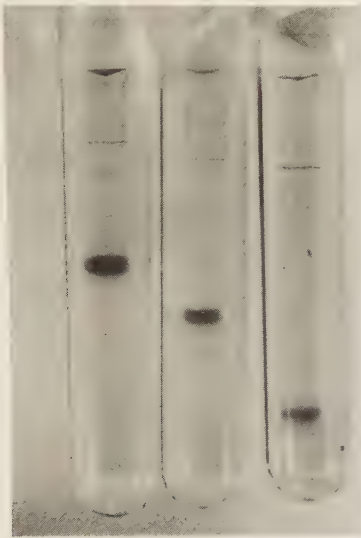


Abb. 8 Disc-elektrophoretische Auftrennung des
isolierten CBG im Puffersystem pH 8,9 bei
3 verschiedenen Polyacrylamidgel-Konzen-
trationen

links: 10 %

Mitte: 7,5 %

rechts: 5 %

Das gleiche Ergebnis wurde auch im Puffersystem pH 7,0 bei obigen Gelkonzentrationen erzielt, wodurch der Beweis erbracht ist, daß die isolierte Substanz nach disc-elektrophoretischer Auftrennung homogen ist.

Zur näheren Charakterisierung der elektrophoretischen Eigenschaften des CBG wurde eine Disc-Elektrophorese in dem Puffersystem pH 8,9 bei einer Gelkonzentration von 7,5 % mit den Referenzsubstanzen Transferrin und Rinderalbumin durchgeführt.

Im 1. Röhrchen ist ein Gemisch aus beiden Referenzsubstanzen und CBG aufgetragen (25 µg Rinderalbumin, 25 µg Transferrin, 10 µg CBG), im 2. Röhrchen Transferrin, im 3. Rinderalbumin (mit Polymerisationsprodukten), im 4. nur CBG.

Im Vergleich zu den beiden Substanzen wandert das CBG im Bereich eines α_1 -Globulins (Abb. 9).



Abb. 9 Elektrophoretisches Verhalten des CBG
im Vergleich zu den Referenzsubstanzen
Transferrin und Rinderalbumin

- (von links) 1. Röhrchen: Rinderalbumin,
Transferrin, CBG
2. Röhrchen: Transferrin
3. Röhrchen: Rinderalbumin
4. Röhrchen: CBG

3.2.2. SDS-Elektrophorese

Das CBG wurde in der SDS-Elektrophorese im Puffersystem pH 8,9 und bei den Gelkonzentrationen 10, 7,5 und 5 % aufgetrennt. Es ist jeweils nur eine Bande zu erkennen, wodurch eine Verunreinigung des CBG durch ein Protein mit anderem Molekulargewicht ausgeschlossen ist.

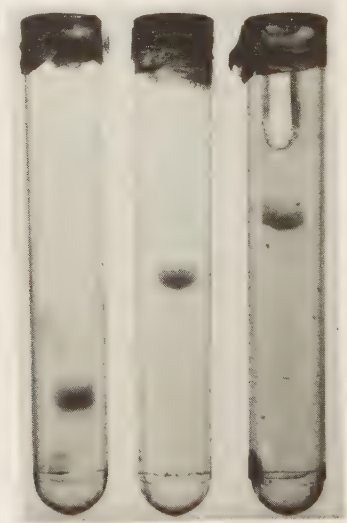


Abb. 10 Auftrennung des CBG in der SDS-Elektrophorese im Puffersystem pH 8,9 und folgenden Gelkonzentrationen

links: 10 %

Mitte: 7,5 %

rechts: 5 %

3.2.3. Isoelectric focusing

Obwohl in der Disc-Elektrophorese und der SDS-Elektrophorese die isolierte Substanz als homogene Bande wandert, trennt sich das Protein im Isoelectric focusing in 5 Banden auf. Es bleibt offen, ob es sich hier um eine eventuell vorhandene Mikroheterogenität handelt, wie sie vor allem für Glycoproteine beschrieben wird, oder nur um Abbauprodukte, die während der Präparation durch bakterielle Zerstörung des CBG entstanden sind. Der isoelektrische Punkt errechnet sich auf 3,7 - 4,2 (Abb. 11).



Abb. 11: Auftrennung des CBG nach seinem isoelektrischen Punkt
pH-Gradient: 3,5 - 5,0
Isoelektrischer Punkt: pH 3,7 - 4,2

3.2.4. Immunelektrophorese

Die CBG-Lösung, die auf die Agargelplatte aufgetragen worden ist, bildet mit dem CBG-Antiserum nur eine Präzipitationslinie, was als weiteres Reinheitskriterium anzusehen ist.

3.2.5. Ouchterlony-Doppeldiffusions-Test

Nach Diffusion des CBG-Antiserums gegen die CBG-Lösung ist nur eine Präzipitationslinie erkennbar. Ebenso bildet Normalserum mit CBG-Antiserum eine Präzipitationsbande. Da die zwei Linien ineinander übergehen, sind beide Antigene als identisch zu betrachten.

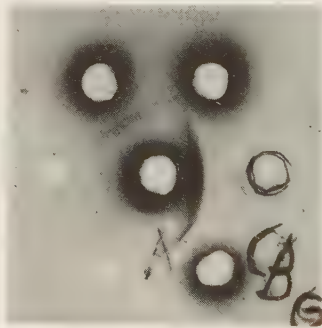


Abb. 12: Immunologischer Reinheitsnachweis des CBG im Ouchterlony-Doppeldiffusions-Test

CBG-Antiserum (Mitte) diffundiert gegen Normalserum (links oben und rechts unten) und gegen die CBG-Lösung (rechts). Keine Präzipitationslinie zwischen CBG-Antiserum und Albumin (rechts oben)

3.2.6. Ultrazentrifugation

Das Scannerbild des Sedimentationsgeschwindigkeitslaufes, bei dem bei 280 nm die optische Dichte in der Zelle gemessen wird, zeigt einen homogenen Kurvenverlauf und schließt somit Verunreinigungen mit nieder- und hochmolekularen Bestandteilen aus. Der Sedimentationskoeffizient, umgerechnet auf 20^o C und Wasser, errechnet sich auf 3,6 S (Abb. 13).

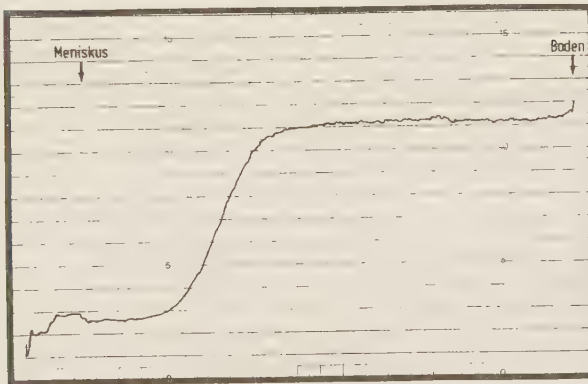


Abb. 13 Scannerbild des Sedimentationsgeschwindigkeitslaufes bei 56 000 UpM und 29,9°C

Beim Gleichgewichtslauf wird die optische Dichte ebenfalls bei 280 nm gemessen.

An der Ordinate wird der Logarithmus der CBG-Konzentration in mm-Schreiberausschlag aufgetragen, an der Abszisse das Quadrat des Abstandes vom Rotationszentrum. Die gemessenen Punkte liegen nahezu auf einer Geraden, was als weiteres Kriterium für die Homogenität des CBG anzusehen ist.

Nach dieser Geraden errechnet sich das Molekulargewicht auf $50\,700 \pm 2500$, das partielle spezifische Volumen auf 0,69 ml/g und der Diffusionskoeffizient auf 5,6 D (Abb. 14).

Aus Molekulargewicht, Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten läßt sich der Stokes Radius, ein Maß für die Größe des Moleküls, auf 38 Å berechnen.

Aufgrund des Quotienten des Reibungskoeffizienten von 1,5 zählt das CBG noch zu den globulären Molekülen.

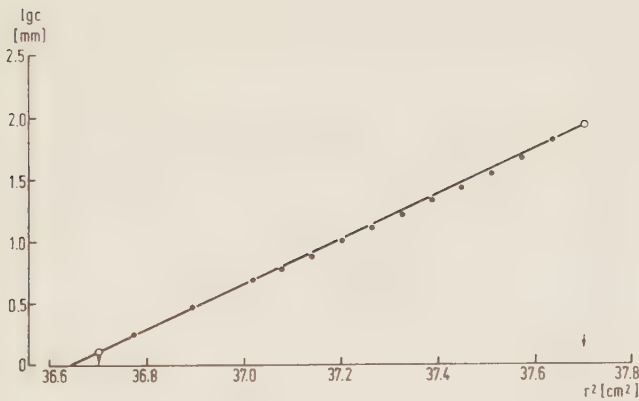


Abb 14 Gleichgewichtslauf in der Ultrazentrifuge

Nach 20-stündiger Zentrifugation wurde ein Gleichgewicht erreicht.

Ordinate: lg der CBG-Konzentration
in mm-Schreiberausschlag

Abszisse: Quadrat des Abstandes vom
Rotationszentrum

3.2.7. Scatchard-Plot

Die Assoziationskonstante errechnet sich aus der Steigung der Geraden auf $0,4 \times 10^8$ l/Mol. Im Vergleich zu Bindungsstudien, die mit Hilfe der Äquilibriumsdialyse durchgeführt worden sind, (50, 56, 71), liegt diese Assoziationskonstante zu niedrig, was methodisch durch den "strippenden" Effekt der G-10-Säulchen begründet ist, da bei dieser Bound-Free-Trennung trotz der kleinen Säulchen der Protein-Steroid-Komplex einer Dissoziation unterworfen ist.

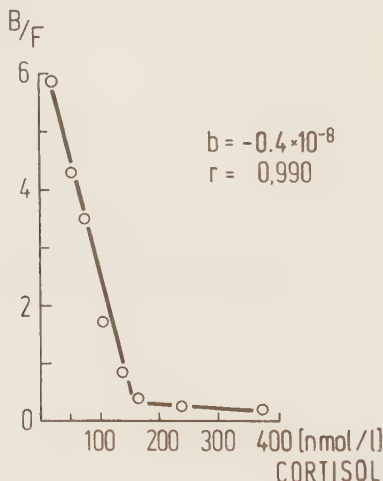


Abb. 15 Bestimmung der Assoziationskonstanten des isolierten CBG zum Cortisol mit Hilfe des Scatchard-Plots

Ordinate: Verhältnis des CBG-gebundenen zum freien Anteil des Cortisol-Tracers

Abszisse: Das Produkt aus prozentualer Tracerbindung und der molaren Konzentration der eingesetzten Cortisol-Menge ergibt die Menge des CBG-gebundenen Cortisols

3.2.8. Quantitative Aminosäureanalyse und
 Bestimmung des Zuckeranteils des CBG

Die Ergebnisse der Aminosäureanalyse von 2 verschiedenen CBG-Präparationen sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Auffallend ist der hohe Anteil an Asparaginsäure und Glutaminsäure, der für den niedrigen isoelektrischen Punkt des CBG verantwortlich ist. Durch den Gehalt an Tyrosin von 5 - 7 % ist die kurze Reaktionszeit bei der radioaktiven Markierung des CBG bedingt.

Das Ergebnis der quantitativen Zuckeranalyse des CBG ist im unteren Teil der Tab. 7 aufgeführt, der Gesamtzuckergehalt errechnet sich auf 35,2 %.

Tab. 7 Quantitative Aminosäurenanalyse von 2 verschiedenen CBG-Präparationen und quantitative Zuckeranalyse von 1 CBG-Präparation

Die linke Säule gibt die Anzahl der Aminosäuren pro Mol CBG an,

die rechte Säule den prozentualen Anteil einer Aminosäure am Polypeptidrest des CBG

(Molekulargewicht des Polypeptidrestes: 32 900)

Im unteren Teil der Tabelle ist die Zuckerzusammensetzung des CBG aufgeführt.

Aminosäuren:	mol pro mol CBG		g pro 100 g Polypeptid	
Präparation	I	II	I	II
Lysin	28	28	8,4	8,4
Histidin	11	12	5,2	5,7
Arginin	10	10	5,3	5,3
Asparaginsäure	35	37	14,1	14,9
Threonin	18	17	6,5	6,1
Serin	21	16	6,7	5,1
Glutaminsäure	33	34	14,7	15,2
Prolin	-	8	-	2,7
Glycin	11	10	2,5	2,2
Alanin	14	15	3,7	4,0
Cystein	-	-	-	-
Valin	18	21	6,4	7,4
Methionin	12	11	5,4	5,0
Isoleucin	15	18	5,9	7,1
Leucin	35	39	13,9	15,5
Tyrosin	13	9	7,1	4,9
Phenylalanin	23	25	11,8	12,8

Zuckerzusammensetzung in Gewichtsprozent

Mannose	9,6
Galactose	5,3
Glucosamin	10,3
Sialinsäure	10,0

3.3. Ergebnisse zum Radioimmunoassay

3.3.1. Ergebnisse zur Austestung des Antikörpers

Die maximale Bindung betrug bei allen Antikörpern nahezu 100 %, die unspezifische Bindung, bei der kein Antikörper eingesetzt wird, lag zwischen 5 und 10 %.

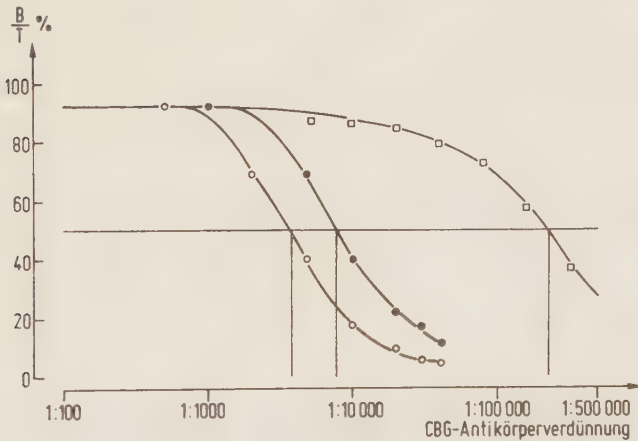


Abb. 16 Antikörper-Verdünnungskurven bei 3 ver-
schiedenen Blutentnahmen des Kaninchens Nr.1

Verdünnungskurve nach der

- 1. Boosterung
- 2. Boosterung
- 3. Boosterung

Ordinate: % Tracerbindung

Abszisse: Antikörper-Verdünnung im loga-
rithmischen Maßstab

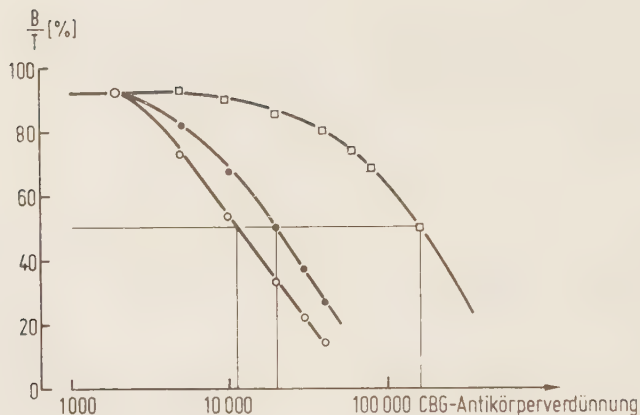


Abb. 17 Antikörper-Verdünnungskurven bei 3 verschiedenen Blutentnahmen des Kaninchens Nr.2
Verdünnungskurve nach der

- — ● — ● 1. Boosterung
- — ○ — ○ 2. Boosterung
- — □ — □ 3. Boosterung

Ordinate: % Tracerbindung

Abszisse: Antikörper-Verdünnung im logarithmischen Maßstab

Tab. 8 Verlauf des Antikörper-Titers
nach den Boosterungen

Datum der Injektion	12.7.76	3.8.76	24.8.76	10.2.77
CBG-Menge (µg)	81	130	115	120
Titer K ₁	-	1:8000	1:4000	1:220000
Titer K ₂	-	1:20000	1:11000	1:160000

Die Blutentnahme erfolgte jeweils 8 Tage nach der
Boosterung.

Der in der Tabelle angegebene Titer entspricht einer
50 %igen Tracerbindung.

Erstaunlicherweise fällt der Titer bei beiden Kanin-
chen nach der 2. Boosterung auf die Hälfte ab. Erst
als nach einer Pause von 7 Monaten erneut geboostert
wurde, konnte ein Anstieg des Titers gegenüber der
1. Blutentnahme um ein 10 - 20faches verzeichnet wer-
den.

Für alle Messungen des CBG im Radioimmunoassay wurde
der Antikörper des 2. Kaninchens bei der 1. Blutent-
nahme verwendet, da dieser uns relativ früh zur Ver-
fügung stand.

3.3.2. Ergebnisse zur Markierung des CBG

3.3.2.1. Berechnung der spezifischen Aktivität des Tracers

Die spezifische Aktivität errechnet sich aus der Aktivität des von der Con A-Säule eluierten CBG-Peaks (Abb. 18) und aus der eingesetzten Menge an CBG (2.2.5.3.).

Gesamtaktivität: 796 000 cpm (0,5 mCi)

Aktivität des CBG-Peaks: 385 200 cpm $\hat{=}$ 49 %

Von den 10 μ g CBG, die eingesetzt worden sind, werden 8 μ g wieder eluiert; somit errechnet sich eine spezifische Aktivität von 31 μ Ci/ μ g CBG.

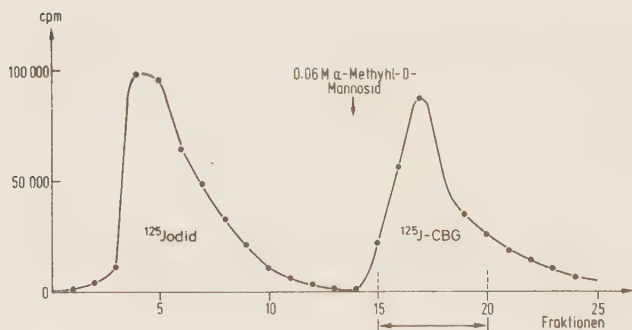


Abb. 18 Abtrennung des freien ¹²⁵Jod vom markierten CBG über eine Con A-Sepharose-Säule

Ordinate: Counts pro Minute

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

Pfeil: gepoolte Fraktionen

3.3.2.2. Nachreinigung des CBG-Tracers

Zur Nachreinigung des CBG-Tracers wurde eine QAE-Sephadex A-50-Säule (1,5 x 20 cm) mit 0,18 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,6 äquilibriert. Die Fraktionen 15 - 20 des Eluates der Con A-Säule (Abb. 18) wurden aufgetragen und ein Gradient von 0,18 M - 0,24 M NaCl angeschlossen, dessen Gesamtvolumen 300 ml betrug.

Obwohl mit Hilfe der QAE-Sephadex A-50-Säule noch etwas ^{125}Jod abgetrennt werden konnte, brachte dieser Schritt genauso wie die chromatographische Auftrennung über Cortisol-Sepharose und Hydroxylapatit keine Verbesserung der Qualität des Tracers.

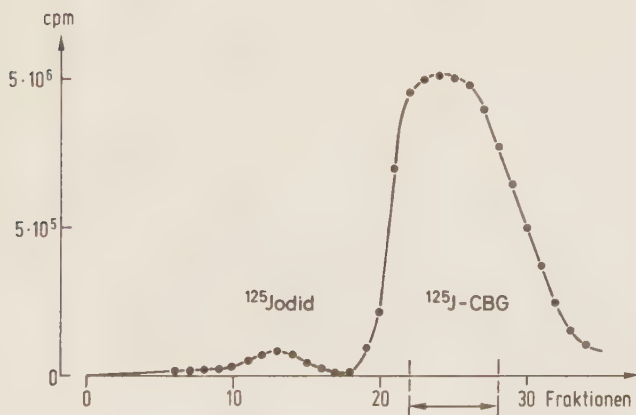


Abb. 19 Nachreinigung des CBG-Tracers über QAE-Sephadex A-50-Säule

Ordinate: Counts pro Minute

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

3.3.3. Ergebnisse zur Erstellung einer
Kalibrierstandardkurve

3.3.3.1. Ermittlung der für den Assay optimalen
Antikörper-Verdünnung

Mit dem unter 2.2.5.5.1. beschriebenen Versuch sollte die optimale Antikörper-Verdünnung ermittelt werden, die dadurch gekennzeichnet ist, daß die im Normalserum gemessene CBG-Konzentration im steilsten Bereich der Eichkurve liegt, der durch die Angabe von 50 % Intercept gekennzeichnet ist.

Tab. 9

Antikörper-Verdünnung	50 % Inter- cept (µg%)	Serumverdünnung
1:16 000	5,33	1:800
1: 8 000	9,66	1:400
1: 2 000	45,3	1:100

Da eine Serumverdünnung von über 1:100 sehr aufwendig ist, wird die Eichkurve durch Erhöhung der Antikörper-Konzentration unempfindlich gemacht.

Bei den folgenden radioimmunologischen Bestimmungen des CBG wird das Serum 1:100 und der Antikörper 1:3000 verdünnt eingesetzt.

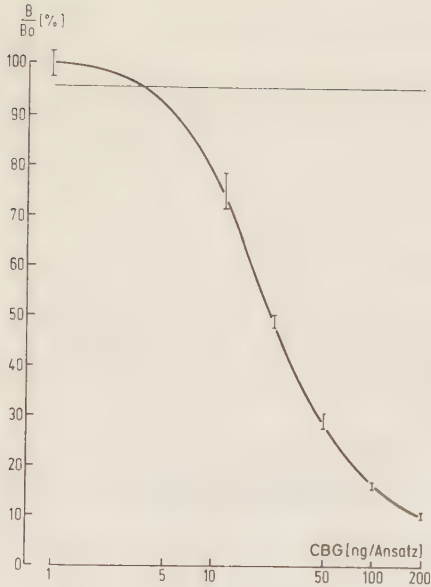


Abb. 20 Kalibrierstandardkurve des CBG

Untere Nachweisgrenze: 2 ng CBG/Ansatz
($\bar{x}_B - 3s$)

50 % Intercept: 23,8 ng/ 0 Ansatz

Antikörper-Verdünnung: 100 μ l Antiserum
1:3000 verdünnt

Serumverdünnung: 100 μ l Serum
1:100 verdünnt

Ordinate: % Tracerbindung

Abszisse: Menge des CBG pro Ansatz

3.3.3.2. Qualitätskontrolle des Radioimmunoassays,

3.3.3.2.1. Präzision

Die Präzision der Methode von Tag zu Tag wurde mit einem gepoolten Kontrollserum überwacht, der Variationskoeffizient betrug 7,43 % ($3,3 \pm 0,25$ mg CBG/100 ml; $\bar{x} \pm s$, n = 23).

3.3.3.2.2. Richtigkeit

Da uns keine Referenzstandards zur Verfügung standen, konnte die Richtigkeit der Methode nur indirekt durch die folgenden Untersuchungen nachgewiesen werden.

Wiederfindung von CBG-Kalibrierstandards im Serum

Einem Kontrollserum wurden in steigender Menge Eichstandards zugesetzt. Die Wiederfindequoten für die bekannten Mengen kalten CBG-Standards betrugen 100 %.

Serumverdünnungen

Von einem Normalserum und einem Schwangerenserum wurde mit Puffer A eine Verdünnungsreihe von 1:25 bis 1:800 angelegt und jeweils 100 μ l davon als Doppelwert in den Assay eingesetzt (Abb. 21).

Die Verdünnungen des Normalserums und des Schwangerenserums ergeben eine Gerade und liegen parallel zueinander.

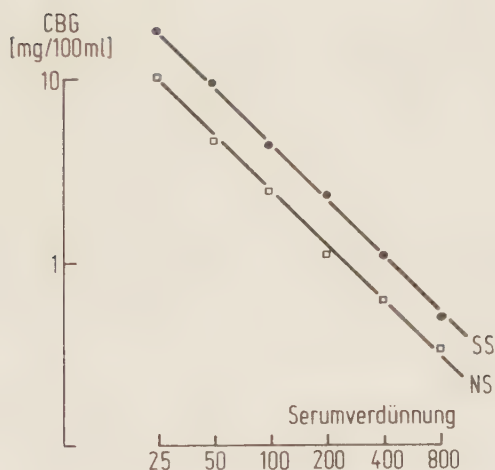


Abb. 21 Serumverdünnungskurven eines Normalserums
und eines Schwangerenserums

Ordinate: Konzentration des gemessenen CBG
Abszisse: Serumverdünnung

Ordinate und Abszisse sind in logarithmischem Maßstab aufgetragen.

3.3.3.3. Immunelektrophoretischer Ausschluß
einer Kreuzreaktion des Antikörpers
mit anderen Serumproteinen

Das Ergebnis der Immunelektrophorese (3.2.4.) läßt nicht nur auf die Reinheit des CBG schließen, sondern beweist auch, daß das CBG-Antiserum nicht mit anderen Serumproteinen kreuzreagiert. Zum direkten Ausschluß einer Kreuzreaktion mit 3 anderen Proteinen, die im Bereich der α -Globuline wandern, und mit Albumin, wurde ein Ouchterlony-Doppeldiffusionstest durchgeführt, bei dem das CBG-Antiserum gegen α_2 -Makroglobulin, α_2 -Haptoglobin, α_1 -Antitrypsin (Abb. 22) und Albumin (Abb.12) diffundierte. Bei keinem dieser Proteine zeigte sich eine Präzipitationslinie als Ausdruck einer Antigen-Antikörper-Reaktion.

Nur mit Normalserum und der CBG-Lösung wurde eine Präzipitationslinie sichtbar, wodurch eine Kreuzreaktion des CBG-Antiserums mit anderen Serumproteinen ausgeschlossen war.

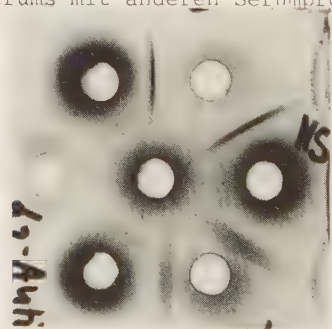


Abb. 22 Direkter Ausschluß einer Kreuzreaktion des
CBG-Antiserums mit anderen Serumproteinen
im Ouchterlony-Doppeldiffusions-Test

CBG-Antiserum diffundiert gegen

- α_2 -Makroglobulin (rechts oben)
- α_2 -Haptoglobin (rechts unten) und
- α_1 -Antitrypsin (links)

Zur Kontrolle wurde an den restlichen Stellen
Normalserum aufgetragen

3.3.3.4. Ausschluß einer Kreuzreaktion des
CBG-Antiserums mit TBG

Der Ausschluß einer Kreuzreaktion des CBG-Antiserums mit dem Thyroxin-bindenden Globulin (TBG) ist von besonderer Bedeutung, da sich beide Proteine elektrophoretisch nicht auftrennen lassen und sich auch ihre Serumspiegel unter bestimmten klinischen Bedingungen gleichartig verhalten.

Der Nachweis, daß keine Kreuzreaktion vorliegt, wurde indirekt durch den Radioimmunoassay erbracht, bei dem 200 ng TBG in den Testansatz (2.2.5.4.) eingesetzt wurden. Das TBG verdrängt den CBG-Tracer nicht vom Antikörper.

3.3.3.5. Einfluß des Cortisols auf
den Radioimmunoassay

Der Einfluß verschiedener Konzentrationen des Cortisols im Serum auf den Radioimmunoassay wurde dadurch ausgeschlossen, daß selbst nach Zugabe einer Konzentration von 10 µg/ml (dies entspricht einer 100fachen Serumkonzentration an Cortisol) die im Vergleich zum Kontrollserum gemessenen Werte unverändert blieben und somit der Beweis erbracht ist, daß das Cortisol das CBG nicht von seinem Antikörper verdrängt.

3.4. Klinische Ergebnisse

3.4.1. Normalbereich

Die Untersuchung von 40 gesunden Probanden im Alter von 15 - 50 Jahren, zumeist Angehörige des Klinikpersonals, ergab einen Mittelwert für das CBG von $3,4 \pm 0,52$ mg/100 ml ($\bar{x} \pm s$). Davon berechnete sich ein Normalbereich von 2,4 bis 4,4 mg/100 ml ($\bar{x} \pm 2s$).

3.4.1.1. Altersabhängigkeit und Geschlechtsunterschiede

Zur Überprüfung der Altersabhängigkeit der CBG-Spiegel wurden die Probanden in 4 Altersgruppen eingeteilt: 1. Kinder bis zum 5. Lebensjahr,

2. Jugendliche bis zum 15. Lebensjahr,

3. Erwachsene bis zum 50. Lebensjahr und

4. Patienten, die älter als 50 Jahre waren.

Es fand sich eine zweigipfelige Altersabhängigkeit, wobei die CBG-Spiegel von Geburt bis zum generationsfähigen Alter abfielen, dann konstant blieben und nach dem 50. Lebensjahr wieder anstiegen (Tab. 10).

Obwohl der Anstieg des CBG auf Östrogene bekannt war, zeigte sich in keiner der vier Altersgruppen ein signifikanter Geschlechtsunterschied.

Tab. 10 CBG-Spiegel in 4 Altersgruppen
bei männlichen und weiblichen Probanden

Alter (Jahre)	Männer CBG (mg/100 ml)	Frauen CBG (mg/100 ml)
5	$5,14 \pm 0,84$ n = 6	$5,20 \pm 0,79$ n = 3
5-15	$3,92 \pm 0,29$ n = 6	$4,60 \pm 1,30$ n = 23
16-50	$3,30 \pm 0,50$ n = 11	$3,50 \pm 1,20$ n = 17
50+	$4,28 \pm 1,04$ n = 14	$4,28 \pm 1,28$ n = 42

3.4.2. Abhängigkeit der CBG-Spiegel von
endogenen und exogenen Veränderungen
der Östrogenspiegel

3.4.2.1. Anstieg der CBG-Spiegel in der Gravidität

Durch die spezifische CBG-Bestimmung im Radioimmunoassay wurde der aus indirekten Verfahren bekannte Anstieg des CBG im Laufe einer Schwangerschaft quantitativ bestätigt.

In der 16. Schwangerschaftswoche konnte ein signifikanter Anstieg der CBG-Spiegel bestätigt werden ($5,3 \pm 0,2$ mg/100 ml; $\bar{x} \pm s$; $n = 8$), die kontinuierlich bis zum Ende des 2. Trimesters anstiegen ($6,1 \pm 0,35$ mg/100 ml; $\bar{x} \pm s$; $n = 12$) und während des 3. Trimesters ein Plateau zu erreichen schienen ($6,9 \pm 0,24$ mg/100 ml; $\bar{x} \pm s$; $n = 16$) (Abb. 23).

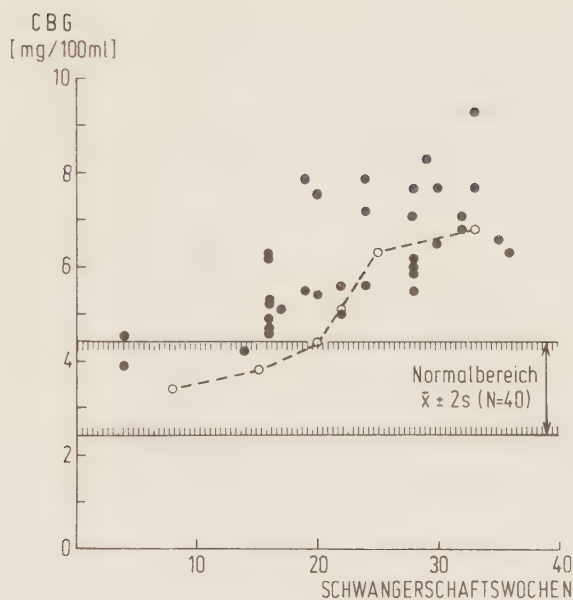


Abb. 23 Anstieg der CBG-Spiegel in der Gravidität

Ordinate: CBG-Konzentration in mg/100 ml

Abszisse: Schwangerschaftswochen

○—○—○
individueller Verlauf einer
Probandin

3.4.2.2, Östrogentherapie bei Frauen

Die Abhängigkeit der CBG-Spiegel von Östrogenen während einer Therapie mit Kontrazeptiva wird in den Abb. 24 und 25 demonstriert. Vier Frauen wurden verschiedene Östrogenpräparate gegeben. Während zweier Phasen der Östrogentherapie lag eine Phase, in der den Patientinnen Placebos gegeben wurden.

Abb. 24 zeigt, daß die CBG-Spiegel nach Applikation von Mestranol und Äthinylöstradiol in allen 4 Fällen anstiegen, von Östradiol-Valerianat nur in einem Fall, während unter der Therapie von Östriol bei keiner Patientin eine Änderung der CBG-Spiegel zu beobachten war. Die endogenen Cortisol-Spiegel stiegen im Vergleich zum CBG signifikant an ($p < 0,001$).

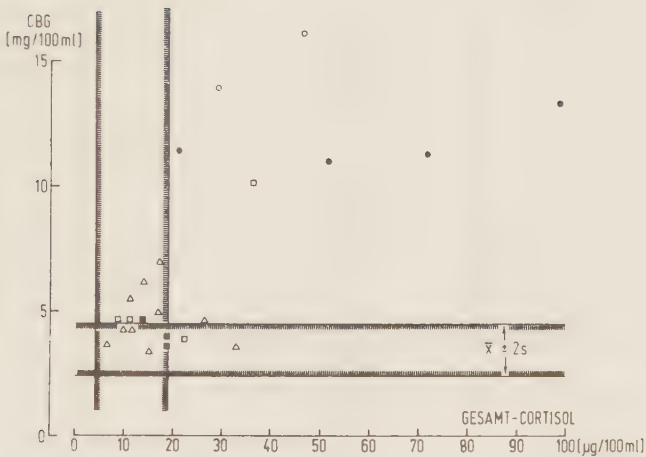


Abb. 24 Unterschiedlicher Anstieg der CBG-Spiegel während der Therapie mit 4 verschiedenen Östrogenpräparaten im Vergleich zum Gesamt-Cortisol

Ordinate: CBG-Spiegel in mg/100 ml

Abszisse: Gesamt-Cortisol-Spiegel in µg/100 ml

Die schraffierten Balken geben die Normalbereiche für CBG und Gesamt-Cortisol an

$r = 0,698$; $p < 0,001$; $b = 3,9$

(Erklärung der Symbole siehe Abb. 25)

Wie erwartet, fielen die Werte des ^3H -Cortisol-uptake Tests, der ein Maß für das sog. freie ^3H -Cortisol ist, signifikant ab ($p < 0,001$). Es besteht eine negative Korrelation zwischen den CBG-Spiegeln und den Werten für das sog. freie ^3H -Cortisol.

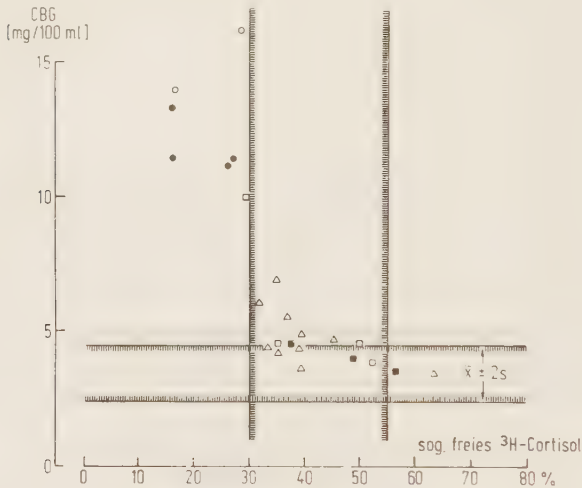


Abb. 25 Unterschiedlicher Anstieg der CBG-Spiegel während der Therapie mit 4 verschiedenen Östrogenpräparaten im Vergleich zum sog. freien ^3H -Cortisol

- Mestranol - 80 μg /Tag
- Äthinylöstradiol - 80 μg /Tag
- Östradiol-Valerianat - 40 mg/14 Tage
- Östriol - 2 mg/Tag
- △—△—△ Placebo

Ordinate: CBG-Spiegel in mg/100 ml
Abszisse: sog. freies ^3H -Cortisol

Die schraffierten Balken geben die Normalbereiche für das CBG und das sog. freie ^3H -Cortisol an.

3.4.2.3. Östrogentherapie bei Männern

Ein Anstieg der CBG-Spiegel konnte bei 10 männlichen Patienten beobachtet werden, die wegen eines Prostatacarcinoms mit Fosfestrol (Honvan^R) therapiert wurden. Die tägliche Dosis lag zwischen 0,5 und 1,5 g. Nach Beginn der Therapie konnte ein kontinuierlicher, dosisabhängiger Anstieg der CBG-Spiegel gemessen werden; sie erreichten die Spiegel der mit Östrogenen behandelten Frauen.

Der Anstieg der CBG-Spiegel unter dem Einfluß von Fosfestrol war signifikant höher als der der TBG-Spiegel derselben Patienten (Abb. 26).

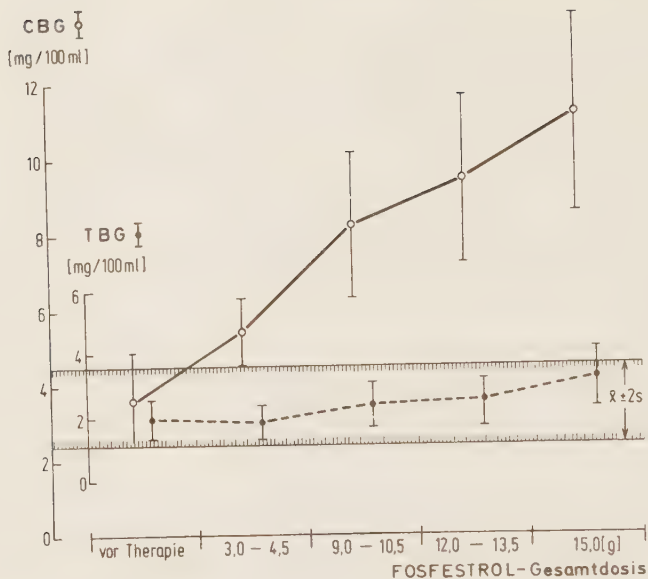


Abb. 26 Anstieg der CBG-Spiegel im Vergleich zum TBG unter steigender Dosis von Fosfestrol (Honvan^R) bei 10 männlichen Patienten mit Prostatacarcinom

Ordinate: CBG- bzw. TBG-Konzentration in mg/100 ml

Abszisse: Fosfestrol-Gesamtdosis in g

Die schraffierten Balken geben die obere und untere Grenze des gemeinsamen Normalbereichs für CBG und TBG an.

durchgezogene Linie: CBG-Spiegel in mg/100 ml

unterbrochene Linie: TBG-Spiegel in mg/100 ml

3.4.2.4. Zyklusabhängigkeit der
 CBG-Spiegel

Nachdem die Östrogenabhängigkeit der CBG-Spiegel nachgewiesen war, stellte sich die Frage, ob auch der kurzfristige zyklische Anstieg der endogenen Östrogenspiegel bei Frauen im generationsfähigen Alter eine Änderung der CBG-Spiegel bewirkt.

Zur Klärung dieser Frage wurden bei 3 gesunden Frauen im Alter von 23 bis 28 Jahren alle 3 - 5 Tage im Verlauf eines Zyklus die CBG-Spiegel bestimmt.

Da der Variationskoeffizient der über den Zyklus gemessenen individuellen Werte nicht höher lag als der Variationskoeffizient des CBG-Radioimmunoassays, konnten zyklusabhängige Schwankungen nicht bestätigt werden.

Tab. 11 CBG-Spiegel im Verlauf eines
Menstruationszyklus bei 3 jungen
Frauen

Aus den individuellen Werten während
des Zyklus wurden jeweils Mittelwert
und Variationskoeffizient berechnet

Tag im Zyklus	CBG-Spiegel (mg/100 ml)		
	B.C. 23 J.	M.M. 23 J.	F.R. 28 J.
3 - 7	2,9	3,3	4,4
8 - 11	2,8	3,4	3,9
12 - 14	2,8	3,1	3,7
15 - 18	2,7	3,0	3,7
19 - 21	2,6	3,3	4,2
22 - 25	2,9	3,1	3,8
26 - 29	3,2	3,2	3,3
$\bar{x} \pm s$	2,8	3,2	3,8
VK	6,7	4,4	9,3

3.4.2.5. CBG-Spiegel während der Behandlung
mit dem "Antigonadotropin" Danazol

Für das Danazol (2,3-Isoxazol-Derivat des 17- α -Äthinyltestosteron; Fa.Winthrop, Gießen) wird eine antiöstrogene Wirkung diskutiert (2), da es bei chronischer Applikation zu Zeichen des Östrogenmangels am Endometrium und Vaginalepithel kommt.

Das Danazol supprimiert den LH- und Östradiol-Peak in der Mitte eines Menstruationszyklus, beeinflusst jedoch nicht die Basalsekretion beider Hormone.

12 Frauen wurden wegen Endometriose und Mastopathia cystica mit 400 mg Danazol täglich behandelt. Die CBG-Spiegel wurden über einen Behandlungszeitraum von 16 Wochen gemessen. Im Gegensatz zu den TBG-Spiegeln, die nach 4-wöchiger Therapie um 50 % des Ausgangswertes abfielen (32), konnte selbst nach 12 - 16 Wochen keine Änderung der CBG-Spiegel beobachtet werden (Tab. 12)

Tab. 12 CBG- und Cortisol-Spiegel vor und während der Behandlung mit Danazol bei 12 Frauen im Vergleich zu TBG, T₄, Östradiol und LH

	vor Therapie	nach 4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen
LH (ng/ml)	49 ± 19	40 ± 23	53 ± 33	56 ± 45
Östradiol (ng/ml)	0,13± 0,05	0,18± 0,09	0,17± 0,04	0,15± 0,05
CBG (mg/100 ml)	3,5 ± 1,5	3,4 ± 1,2	3,2 ± 1,1	3,1 ± 1,5
Cortisol (µg/100 ml)	15,5 ± 6,5	12,4 ± 6,8	13,7 ± 2,8	15,3 ± 9,8
TBG (mg/100 ml)	1,75± 0,46	0,82± 0,28	0,71± 0,29	0,57± 0,16
T ₄ (µg/100 ml)	6,3 ± 0,5	5,2 ± 0,2	3,7 ± 0,9	3,4 ± 0,8

3.4.3. Einfluß von primär veränderten
Cortisol-Spiegeln auf das CBG

Bei 6 Patienten mit Cushing-Syndrom und 5 Patienten mit M.Addison wurden CBG-Spiegel gemessen. Bei keinem der Patienten lag das CBG außerhalb des Normalbereiches.

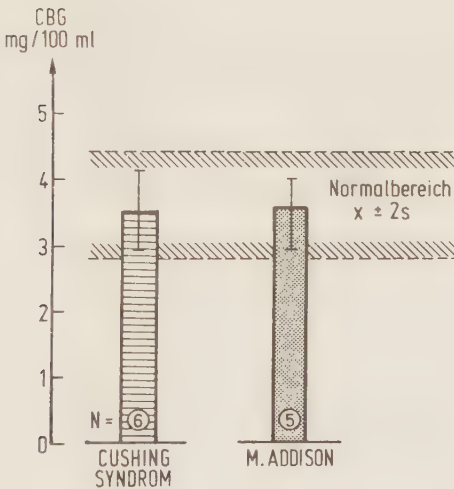


Abb. 27 CBG-Spiegel bei Cushing-Syndrom
und M.Addison

3.4.4. CBG-Spiegel bei erniedrigtem TBG

3.4.4.1. Genetisch bedingter TBG-Mangel

Da bekannt ist, daß die Gene für beide Proteine x-chromosomal vererbt werden, wurde untersucht, ob beide Gene sehr nah auf dem Chromosom zusammenliegen und somit gekoppelt vererbt werden könnten. Dafür fanden wir keine Anhaltspunkte, da bei 9 Patienten, 8 Männern und 1 Frau, mit genetisch gesichertem TBG-Mangel durchweg normale CBG-Spiegel gemessen wurden (Abb. 28). Eine Koinzidenz von TBG- und CBG-Mangel fanden wir hiermit nicht.

3.4.4.2. Symptomatisch bedingter TBG-Mangel

Bei 7 Patienten mit symptomatisch bedingtem TBG-Mangel, wie er in katabolen Stoffwechselsituationen, z. B. bei konsumierenden Erkrankungen, nephrotischem Syndrom, dekompensierter Leberzirrhose etc. vorkommt, war das CBG ebenfalls erniedrigt. Der CBG-Mangel war jedoch nicht so ausgeprägt wie der TBG-Mangel (Abb. 28).

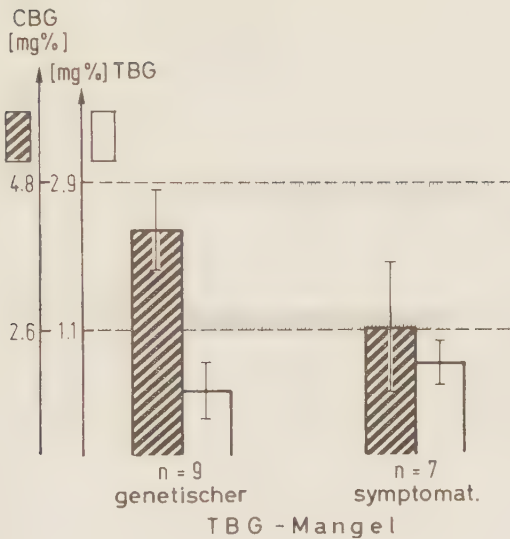


Abb. 28 CBG- und TBG-Spiegel bei genetisch-
bedingtem und symptomatischem
TBG-Mangel

linke schraffierte Säulen: CBG-Spiegel
(mg/100 ml)

rechte offene Säulen: TBG-Spiegel (mg/100 ml)

Die schraffierten Balken geben den ge-
meinsamen Normalbereich für beide Pro-
teine an.

3.4.4.3. CBG- und TBG-Spiegel unter Nulldiät

Bei 14 Patienten, die sich einer Nulldiät unterzogen, wurden wöchentlich CBG- und TBG-Spiegel gemessen. Der Abfall des TBG war deutlicher als der des CBG (61).

Tab. 13 CBG- und TBG-Spiegel unter
totalem Fasten

Totales Fasten

	TBG (mg/100 ml)	CBG (mg/100 ml)
Anfang	2,6 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 1,1
7.-15.Tag	2,2 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 1,4
25.-30."	1,9 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 0,9
Ende	2,0 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,8

Aufbaudiät

	TBG (mg/100 ml)	CBG (mg/100 ml)
5.-6.Tag	1,9 $\pm$ 0,3	3,9 $\pm$ 1,5
15.-30.Tg.	2,4 $\pm$ 0,6	3,5 $\pm$ 1,0

4. DISKUSSION

4.1. Methode

Die Spiegel des Corticosteroid -bindenden Globulins (CBG) im Serum wurden bisher nur durch indirekte Bestimmungsmethoden ermittelt. Um das Verhalten der CBG-Spiegel unter bestimmten klinischen Situationen, besonders auch im Vergleich zu einem anderen Transportprotein, dem Thyroxin-bindenden Globulin (TBG), untersuchen zu können, mußte eine Methode aufgebaut werden, die es erlaubt, das CBG quantitativ im Serum zu bestimmen. Als hoch spezifisch und zugleich am wenigsten aufwendig bot sich eine radioimmunologische Bestimmungsmethode an. Voraussetzung hierzu war jedoch die Reindarstellung des CBG.

Die Isolierung einer größeren Menge an CBG, wie sie für den Aufbau eines Radioimmunoassays und für die weitere Charakterisierung dieses Proteins notwendig war, wurde erst durch die Einführung der Affinitätschromatographie durch ROSNER (51) wesentlich erleichtert. Zur Kopplung an ein Trägergel, z. B. Sepharose, war die Einführung einer Carboxylgruppe in das Cortisolmolekül notwendig.

In Anlehnung an die von CUATRECASAS (16) beschriebene Methode der Kopplung von Östradiol-Hemisuccinat an die Aminosepharose verwendeten wir Cortisol-Hemisuccinat, das mit Hilfe von wasserlöslichem Carbodi-

imid an AH-Sepharose 4B kovalent gebunden wurde. AH-Sepharose 4B ist ein Trägergel, bei dem über eine "six carbon spacer group" freie Aminogruppen aus der Matrix herausragen.

Neben dem Cortisol-Hemisuccinat als Kopplungs-Substanz ist auch die Verwendung des Cortisol-3-(o-carboxymethyl) oxims oder der Oxidation des Corticosterons nach LE GAILLARD (37) möglich. Da die Kopplung mit Carbodiimid in saurem Milieu erfolgen muß, und das Cortisol-Hemisuccinat in einem pH-Bereich von 5 nicht wasserlöslich ist, mußten organische Lösungsmittel verwendet werden. Obwohl nach CUATRECASAS (16) Sepharose nur mit einer Konzentration an organischem Lösungsmittel von maximal 50 % angegangen werden darf, verwendeten ROSNER (51) und LE GAILLARD (37) jedoch reines Dioxan. Wir erhielten die besten Ergebnisse bei der Kopplung, wenn wir Cortisol-Hemisuccinat in 50 %igem Dimethylformamid lösten.

Die Verwendung der im Verhältnis zur Menge des Plasmas (1,5 l) kleinen Menge an Cortisol-Sepharose (20 ml) geschah in der Absicht, die unspezifische Adsorption von Serumproteinen möglichst gering zu halten, obwohl wir damit eine schlechtere Ausbeute in Kauf nehmen mußten.

Da die Affinität des Cortisols zum CBG bei pH 8,0 am größten ist und mit Veränderung des pH-Wertes in saure und alkalische Bereiche signifikant abnimmt, erfolgte das Nachspülen der Cortisol-Sepharose nach Extraktion des CBG aus dem Plasma zur Entfernung unspezifisch adsorbierter Proteine bei uns

mit Tris-HCl-Puffer pH 8,0 im Gegensatz zu ROSNER und LE GAILLARD, die Natriumphosphatpuffer pH 7,0 verwendeten.

Zur Verdrängung des CBG vom Cortisol der Sepharose fügten wir dem Elutionspuffer in einer Konzentration von 20 mg% Cortisol-Hemisuccinat bei. Wir zogen diese Substanz dem Cortisol vor, da dieses nicht im alkalischen Puffer, sondern nur in Alkohol löslich ist, und eine Alkoholkonzentration im Elutionspuffer von 5 % könnte eventuell zur Denaturierung des CBG führen.

Die Beobachtung von ROSNER, daß nach der Affinitätschromatographie nur CBG und Immunglobuline in der Elektrophorese sichtbar sind, konnte von uns leider nicht nachvollzogen werden, so daß weitere Chromatographien unumgänglich waren. Als sehr effektiv stellte sich die Chromatographie über Con A-Sepharose heraus, bei der die Abtrennung der Glycoproteine vom Albumin und von den Immunglobulinen gelang. Von größter Spezifität für das CBG ist jedoch, wie von allen Autoren (37, 42, 50, 59, 63, 65, 71) beschrieben wird, das Hydroxylapatit, das das CBG im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinen nicht adsorbiert. Die alleinige Chromatographie über Hydroxylapatit im Anschluß an die Affinitätschromatographie reichte zur vollständigen Abtrennung anderer Proteine vom CBG nicht aus, da dieses nach der Affinitätschromatographie nicht wie bei ROSNER nur mehr mit Immunglobulinen kontaminiert war.

Die Wiederfindungsrate über 5 verschiedene Präparationsschritte von 20 % war zufriedenstellend.

Die Reinheit des CBG wurde zunächst in der Disc-Elektrophorese überprüft, bei der das Protein in 2 Puffersystemen und bei jeweils 3 verschiedenen Gelkonzentrationen in einer homogenen Bande wanderte. Ferner zeigte auch die SDS-Elektrophorese keine Verunreinigungen. Bei der Diffusion des CBG-Antiserums gegen CBG-Lösung und Normalserum ließ sich jeweils nur eine Präzipitationslinie erkennen, beide Antigene waren identisch. Die Verunreinigung des isolierten Proteins dürfte im Sedimentationsgeschwindigkeitslauf und Gleichgewichtslauf auf weniger als 1 % geschätzt werden. Die beim Scatchard Plot errechnete steile Regressionsgerade war als Reinheitskriterium von besonderer Wichtigkeit, da durch diesen Versuch der Beweis erbracht war, daß es sich bei dem isolierten Protein um CBG handelt.

Allein die 5 verschiedenen Banden im Isoelectric focusing ließen auf eine Heterogenität des CBG schließen. Es handelt sich hierbei jedoch um eine Mikroheterogenität, die artifiziell bedingt sein kann, d. h. sie ist während der Präparation durch Abbauprodukte entstanden. Eine weitere Möglichkeit zur Klärung dieser Heterogenität ist die Tatsache, daß das CBG aus einem gepoolten Plasma isoliert worden ist und daß bei verschiedenen Personen strukturelle Varianten auftreten. Wahrscheinlich liegt je-

doch eine chemische Mikroheterogenität des CBG vor, wie sie auch für die meisten anderen Glycoproteine beschrieben wird. Den isoelektrischen Punkt errechneten wir auf pH 3,7 - 4,2.

Die von uns ermittelten chemischen Eigenschaften des CBG stimmten mit Werten anderer Autoren gut überein.

So lag das durch Ultrazentrifugation errechnete Molekulargewicht in einem Bereich, der auch von anderen Autoren angegeben wurde. Die Werte schwankten jedoch von Labor zu Labor erheblich. Den höchsten Wert errechnete SLAUNWHITE mit 58 500 (71), weitaus niedriger lagen SEAL und DOE mit 52 000, WESTPHAL mit 51 700 (42) und LE GAILLARD mit 49 500 (36).

Der Sedimentationskoeffizient von 3,6 S war identisch mit früher publizierten Werten (71). Das partielle spezifische Volumen lag bei uns mit 0,69 ml/g etwas niedriger als bei anderen Autoren (0,703 - 0,718 ml/g) (50, 71). Obwohl das CBG aufgrund des Quotienten des Reibungskoeffizienten von 1,5 noch zu den globulären Molekülen zu rechnen ist, nimmt es erwartungsgemäß keine ideale Kugelform an, da bei einem Kohlehydratanteil von 35,2 % die Zuckergruppen aus der Oberfläche des Moleküls herausragen.

Bei der quantitativen Aminosäureanalyse, die sowohl mit den Werten von SEAL und DOE als auch von SLAUN-

WHITE übereinstimmte, fand sich ein Tyrosinanteil von 5 - 7 %, was im Hinblick auf die Markierung des CBG mit ^{125}Jod von besonderem Interesse ist.

Obwohl ROSNER (54) und VAN BAELEN (66) bei der Immunisierung der Kaninchen mit CBG die subkutane bzw. intramuskuläre Applikationsweise bevorzugten und eine zehnmal größere Menge an CBG verwendeten als wir, erreichten wir durch intrakutane Injektion mit durchschnittlich 120 μg CBG außerordentlich gute Ergebnisse. Bereits nach der ersten Boosterung konnte ein brauchbarer Antikörper gewonnen werden, der in einer Verdünnung von 1:20000 den Tracer zu 50 % band. Die maximale Tracerbindung lag bei über 90 %. Nach der dritten Boosterung stieg der Titer sogar bis 1:220 000 an.

Der Variationskoeffizient, der die Präzision des CBG-Radioimmunoassays angibt, lag bei 7,43 % und bewegte sich damit in einem Bereich, den man anderen vergleichbaren Bestimmungsmethoden zugesteht.

Bei der Qualitätskontrolle des Assays durch Serumverdünnungen und Standardwiederfindungen oder immunoelektrophoretische Untersuchungen ließen sich keine Anhaltspunkte für Kreuzreaktionen des Antikörpers mit anderen Proteinen finden.

Im Vergleich zur radialen Immundiffusion, wie sie von ROSNER (54) und VAN BAELEN (66) zur direkten Bestimmung des CBG im Serum angewandt wird, ist der Radioimmunoassay jedoch aufgrund seiner Präzision und besseren Praktikabilität der anderen Methode vorzuziehen.

4.2. Klinik

Der Normalbereich der CBG-Spiegel im Serum lag zwischen 2,4 und 4,4 mg/100 ml. Diese Werte stehen in guter Übereinstimmung mit Werten, die einerseits durch indirekte Verfahren ermittelt wurden (50, 71), andererseits auch mit den Ergebnissen der Immundiffusionsmethode (47, 50, 54, 66).

Ein möglicher Einfluß primär erhöhter oder erniedrigter Cortisol-Spiegel im Serum auf das CBG wurde immer wieder diskutiert (71). Weder bei Patienten mit Cushing-Syndrom noch mit M.Addison lagen die CBG-Spiegel nach unseren Messungen außerhalb des Normalbereiches. Ein Grund für die Diskrepanz der Ergebnisse des Radioimmunoassays und der Methoden, bei denen das CBG bisher nur indirekt abgeschätzt wurde, mag sein, daß das endogene Cortisol bei den letzteren Verfahren in die Messung mit eingeht.

Der durch Östrogene induzierte Anstieg des CBG war von früheren Untersuchungen her bekannt (60, 71) und wurde durch die quantitative und spezifische radioimmunologische Meßmethode gesichert. Bereits in der 16. Schwangerschaftswoche lagen die CBG-Spiegel außerhalb des Normalbereichs, stiegen kontinuierlich bis zum Ende des 2. Trimesters an und schienen wie das Thyroxin-bindende Globulin (TBG) im 3. Trimester ein Plateau zu erreichen (32). Unter einer Östrogen-

therapie war der Anstieg der CBG-Spiegel bei den verschiedenen Östrogenpräparaten unterschiedlich. Das CBG mag somit ein Parameter für die Östrogenwirksamkeit der einzelnen Präparate sein, obwohl noch untersucht werden muß, ob die CBG-Spiegel mit den klinischen Parametern eines Östrogeneffekts korrelieren.

Die Therapie mit Fosfestrol (Honvan^R) bei männlichen Patienten mit Prostatacarcinom bewirkte einen dosisabhängigen Anstieg der CBG-Spiegel, die sogar Werte der mit Östrogenen behandelten Frauen überstiegen. Sowohl bei Frauen als auch bei Männern unter Östrogentherapie ist die Ansprechbarkeit des CBG wesentlich größer als die des TBG, so daß das CBG ein empfindlicherer Parameter für Östrogene zu sein scheint oder daß es zumindest schneller auf Östrogene mit einem Anstieg reagiert als das TBG. Der durch Östrogene induzierte Anstieg des CBG ist durch eine vermehrte Synthese dieses Proteins bedingt und nicht durch einen verminderten Abbau, da nach Clearance-Studien mit markiertem ¹²⁵J-CBG die Halbwertszeit des CBG bei normalen und erhöhten Östrogenspiegeln im Serum gleich ist (58).

Sicherlich sind Östrogene nicht der alleinige regulierende Faktor für die CBG-Spiegel, da der fehlende Geschlechtsunterschied, der Abfall der CBG-Spiegel von Geburt bis zum generationsfähigen Alter und der Wiederanstieg nach dem 50. Lebensjahr gerade in umgekehrtem Verhältnis zur Östrogenkonzentration im Serum stehen.

Im Gegensatz zu der vermehrten Ansprechbarkeit der CBG-Spiegel auf Östrogene zeigte sich eine erhöhte Sensitivität des TBG auf Danazol, einer Substanz, der antiöstrogene Eigenschaften zugeschrieben werden. Während die TBG-Spiegel bereits nach einer 4-wöchigen Therapie auf die Hälfte ihres Ausgangswertes absanken, ließ sich selbst nach einer einjährigen Danazol-Behandlung keine signifikante Änderung der CBG-Spiegel beobachten (32). Eine Interferenz von Danazol und Östrogenen am Rezeptor der Leberzelle muß daher diskutiert werden.

In katabolen Stoffwechselsituationen, wie Null-Diät, schweren, konsumierenden Erkrankungen, dekompensierter Leberzirrhose und nephrotischem Syndrom sank das TBG wesentlich schneller ab als das CBG. Diese Ergebnisse demonstrieren die unterschiedliche Ansprechbarkeit der beiden Transportproteine unter bestimmten metabolischen Veränderungen (32).

Bei 9 Patienten mit gesichertem genetisch bedingtem TBG-Mangel lagen die CBG-Spiegel durchweg im Normalbereich. Diese Untersuchung war insofern von Interesse, als beide Gene x-chromosomal vererbt werden (71) und sich die Frage stellte, ob beide Gene sehr nah auf dem Chromosom lokalisiert sind und somit gekoppelt vererbt werden könnten.

Dafür fanden wir jedoch keine unterstützenden Hinweise, da wir, bei einer allerdings sehr kleinen Probandenzahl, keinen Fall von Koinzidenz von CBG- und TBG-Mangel ermitteln konnten.

5.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Voraussetzung zum Aufbau einer direkten Methode zur Bestimmung des Corticosteroid-bindenden Globulins im Serum ist die Gewinnung einer größeren Menge von reinem CBG.

Die Isolierung wurde mit Hilfe der Affinitätschromatographie und 4 nachfolgenden Chromatographieschritten durchgeführt. CBG wurde aus gepooltem Humanplasma durch die Affinitätschromatographie über AH-Sepharose 4B angereichert, an die Cortisol-Hemisuccinat mit Hilfe der Carbodiimid-Methode kovalent gekoppelt war. Weitere Reinigungsschritte waren die Anionenaustauschchromatographie über QAE-Sephadex A-50, die Affinitätschromatographie für Glycoproteine über Con A-Sepharose und die Adsorptionschromatographie über Hydroxylapatit. Als letzter Schritt der Präparation eines hochgereinigten CBG wurde eine Chromatographie über QAE-Sephadex A-50 mit einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten durchgeführt. Die Wiederfinderate über 5 Präparierschritte betrug 20 %.

Die Reinheit des isolierten CBG konnte durch eine homogene Bande in der Disc- und SDS-Elektrophorese unter Verwendung von 2 verschiedenen Puffersystemen und 3 verschiedenen Gelkonzentrationen demonstriert werden, sowie in den immunoelektrophoretischen Untersuchungen.

Die Mikroheterogenität des CBG wurde im Isoelectric focusing durch 5 verschiedene Banden gezeigt, der isoelektrische Punkt lag in einem pH-Bereich von 3,7 - 4,2.

Mit Hilfe der Ultrazentrifugation wurde das Molekulargewicht auf $50\,700 \pm 2\,500$ berechnet, das partielle spezifische Volumen auf 0,690 ml/g, der Sedimentationskoeffizient auf 3,6 S, der Stokes Radius auf $38\text{ \AA}$ und der Reibungskoeffizient auf 1,5. Die Werte der quantitativen Aminosäureanalyse waren in guter Übereinstimmung zur Literatur, während der Zuckeranteil mit 35,2 % etwas zu hoch lag.

Als weiteres Reinheitskriterium galt die steile Regressionsgerade in den Cortisol-Bindungsstudien (Scatchard Plot), aus denen sich eine Assoziationskonstante des CBG zum Cortisol auf $0,4 \times 10^8\text{ l/Mol}$ errechnen ließ.

Dieses hochgereinigte CBG wurde zur Immunisierung von zwei Kaninchen, zur radioaktiven Markierung mit ^{125}Jod nach der Chloramin-T-Methode und für die Kalibrierstandardkurven verwendet.

Nach der 1. Boosterung wurde ein monospezifischer Antikörper mit einem Titer von 1:20 000 erhalten, der in einer Verdünnung von 1:3000 in den Radioimmunoassay eingesetzt wurde. Die maximale Tracer-

bindung betrug nahezu 100 %. Kreuzreaktionen des CBG-Antiserums mit anderen Serumproteinen wurden durch Immundiffusions-Teste ausgeschlossen. Die Verdünnungskurven von Normal- und Schwangerenserum waren parallel, die Standardwiederfindung betrug 100 %.

Die Präzision des Radioimmunoassays war mit einem Variationskoeffizienten von 7,4 % zufriedenstellend.

Der Normalbereich der CBG-Spiegel im Serum lag zwischen 2,4 und 4,4 mg/100 ml. Es wurde eine zweigipfelige Altersabhängigkeit beobachtet, während signifikante Geschlechtsunterschiede in keiner Altersgruppe nachgewiesen werden konnten. Die bekannte Östrogenabhängigkeit wurde durch die spezifische quantitative Messung der CBG-Spiegel während der Schwangerschaft und bei Frauen und Männern unter Östrogentherapie bestätigt. Der Anstieg der CBG-Werte hing jedoch wesentlich von der Östrogenwirksamkeit der jeweiligen Präparate ab. Während der Therapie mit Danazol, einer "antiöstrogenen" Substanz, kam es zu keinem Abfall des CBG. Primär erhöhte oder erniedrigte Cortisol-Werte im Serum zeigten keinen Einfluß auf die CBG-Spiegel.

Es wurde eine unterschiedliche Ansprechbarkeit der beiden Transportproteine CBG und TBG in bestimmten

Stoffwechsellagen beobachtet. Während das CBG auf Östrogene empfindlicher ansprach, war der Abfall des TBG unter Danazoltherapie und bei katabolen Stoffwechselsituationen signifikanter. Es fand sich keine Koinzidenz genetisch bedingter CBG- und TBG-Varianten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AMARAL, L., S. WERTHAMER
Regulation of immune response in cancer
by plasma. The postulated role of transcortin
Ann.Clin.Lab.Sci. 4/6, 435 (1974)
2. ANDREWS, M. C., A. C. WENTZ
The effects of Danazol on gonadotropins and
steroid blood levels in normal and anovula-
tory women
Amer.J.Obstet.Gynec. 121, 817 (1975)
3. ANGELI, A., D. BISBOCCI, F. MELO
Relative competition of corticosterone,
cortisol, cortisone, 11 deoxycortisol and
prednisolone with (1,2 ³H) cortisol in
various protein binding radioassay systems
Clin. Chim. Acta 61/3, 279 (1975)
4. ASTRUC, M., N. BRESSOT, B. DESCOMPS, A. GRASTES
DE PAULET
The role of transcortin in cortisol trans-
port and cortisol excretion in children
proteinurias
Steroid Lipids Res. 4/1, 30 (1973)
5. BALLARD, P. L., J. P. CARTER, B. S. GRAHAM,
J. D. BAXTER
A radioreceptor assay for evaluation of the
plasma glucocorticoid activity of natural
and synthetic steroids in man
J. Clin. Endocr. 41/2, 290 (1975)
6. BATRA, S., L. P. BENGTSSON, H. GRUNDSSELL,
N.-O. SJÖBERG
Levels of free and protein-bound progesterone
in plasma during late pregnancy
J. Clin. Endocr. Metab. 42, 1041 (1976)
7. BAUM, C. K., R. TUDOR, J. LANDON
A simple competitive protein binding assay
for plasma cortisol
Clin. Chim. Acta 55/2, 147 (1974)

8. BERGINK, E. W., D. L. WOLF, J. L. WITTLIFF,
G. J. BRUINING, M. F. BRYSON, G. B. FORBES
Testosterone-estradiol-binding globulin in
patients with Turner's syndrome: Effects
of estrogens and acute growth hormone ad-
ministration
J. Clin. Endocr. Metab. 42, 1018 (1976)
9. BERNUTZ, C., K. HORN, C. R. PICKARDT
Corticosteroid-binding globulin (CBG):
Isolation and radioimmunological determi-
nation in serum
Acta Endocr. Suppl. 208 (1977)
10. BILLIAR, R. B., M. JASSANI, B. LITTLE
Estrogen and the metabolism of progesterone
in vivo
Amer. J. Obstet. Gynec. 121/7, 877 (1975)
11. BRAUN, J.
Automatisierung der Bestimmung der Bindung
von Cortisol an Serumproteine und des Ge-
samt-Cortisols im Serum (Competitive Protein-
bindungsanalyse)
Dissertation, Universität München (1974)
12. BRIGGS, M. H.
Effects of oral progestogens on estrogen
induced changes in plasma proteins
J. Reprod. Med. 15/3, 100 (1975)
13. CAMERON, E. H. D., S. G. HILLIER, K. GRIFFITHS
Steroid immunoassay
Cardiff (1975)
14. CHEN, P. S. Jr., J. H. MILLS, F. C. BARTTER
Ultrafiltration studies of steroid-protein
binding
J. Endocr. 23, 129 (1961)
15. CROWLEY, M. F., K. J. T. GARBIEN, J. W. TUTTLEBEE
Assessment of a simple competitive protein
binding technique for plasma cortisol assay
Ann. Clin. Biochem. 12/2, 66 (1975)

16. CUATRECASAS, P.
Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamid beads
J. Biol. Chem. 245, 3059 (1970)
17. DAUGHADAY, W. H.
Evidence for two corticosteroid binding systems in human plasma
J. Lab. Clin. Med. 48, 799 (1956)
18. DAUGHADAY, W. H.
Binding of corticosteroids by plasma proteins. I. Dialysis equilibrium and renal clearance studies
J. Clin. Invest. 35, 1428 (1956)
19. DAUGHADAY, W. H.
Binding of corticosteroids by plasma proteins. II. Paper electrophoresis and equilibrium paper electrophoresis
J. Clin. Invest. 35, 1434 (1956)
20. DAUGHADAY, W. H.
Binding of corticosteroids by plasma proteins. The electrophoretic demonstration of corticosteroid binding protein
J. Clin. Invest. 37, 519 (1958)
21. DAUGHADAY, W. H.
Steroid protein interaction
Physiol. Rev. 39, 885 (1959)
22. DE MOOR, P., O. STEENO, A. HENDRIX
Clinical features observed in patients with unexplained low cortisol binding capacity
Acta Endocr. 48, 272 (1965)
23. DESBUQUOIS, B., G. D. AURBACH
Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays
J. Clin. Endocr. Metab. 33, 732 (1971)

24. DOE, R. P., R. N. FERNANDEZ, U. S. SEAL
Measurement of corticosteroid binding
globulin in man
J. Clin. Endocr. 24, 1029 (1964)
25. DOE, R. P., F. N. LOHRENZ, U. S. SEAL
Familial decrease in corticosteroid binding
globulin
Metabolism 14, 940 (1965)
26. FELDMANN, H., D., D. RODBARD
Mathematical theory of radioimmunoassay
In: Odell, W. D., and W. H. Daughaday (eds.)
Principles of competitive protein-binding
assays
J. B. Lippincott Comp., Philadelphia, 1971, 158
27. GABRIEL, O.
Analytical disc gel electrophoresis
Methods in Enzymology
28. GUERIGUIAN, J. L., M. E. SAWYER, W. H. PEARLMAN
A comparative study of progesterone- and
cortisol-binding activity in the uterus and
serum of pregnant women
29. GREENWOOD, F. C., W. H. HUNTER, J. S. GLOVER
The preparation of ¹³¹I-labeled human growth
hormone of high specific radioactivity
Biochem. J. 89, 114 (1963)
30. HADJIAN, A. J., M. CHEDIN, C. COCHET, F. M. CHAMBAZ
Cortisol binding to proteins in plasma in
the human neonate and infant
Pediat. Res. (Baltimore) 9/1, 40 (1975)
31. HORN, K. J., J. HENNER, O. A. MÜLLER, P. C. SCRIBA
Mechanisierte Hormonanalytik mittels simulta-
ner Säulenchromatographie
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 173 (1975)
32. HORN, K., TH. KUBICZEK, C. R. PICKARDT, P. C. SCRIBA
Thyroxin-bindendes Globulin (TBG): Präparation,
radioimmunologische Bestimmung und klinisch-
diagnostische Bedeutung
Klin. Wschr. 55, 881 (1977)

33. KAUPPILA, A., P. A. JARVINEN, P. YLOSTALO,
M. REINILA
Adrenocortical function of patients using
oral contraceptives
Acta Obstet. Gynec. Scand. 53/2, 155 (1974)
34. KEHLET, H., C. BINDER, C. ENGBAERK
Cortisol binding capacity in plasma during
anaesthesia and surgery
Acta Endocr. (KBH.) 75/1, 119 (1974)
35. KLEY, H. K., J. HERRMANN, K. D. MORGNER, H. L.
KRUSKEMPER
Effects of testosterone enanthate on plasma
concentrations of thyroxine, cortisol,
testosterone and hormone binding proteins
in patients with hypogonadism
Hormone Metabol. Res. (Stuttg.) 5/4, 271 (1973)
36. LE GAILLARD, F., K. K. HAN, M. DAUTREVAUX
Caractérisation et propriétés physico
chimiques de la transcortine humaine
Biochimie 57/5, 559 (1975)
37. LE GAILLARD, F., A. RACADOT, N. RACADOT-LEROY,
M. DAUTREVAUX
Isolement de la transcortine humaine par
chromatographie d'affinité
Biochimie 56, 99 (1974)
38. LITWACK, G., R. FILLER, S. A. ROSENFELD
Liver cytosol corticosteroid binder, a
hormone receptor
J. Biol. Chem. 248/21, 7481 (1973)
39. LOHRENZ, F. N., U. S. SEAL, R. P. DOE
Adrenal function and serum protein concen-
trations in a kindred with decreased
corticosteroid-binding globulin (CBG)
concentration
J. Clin. Endocr. Metab. 27, 966 (1967)

40. MARSCHNER, I., H. DOBRY, F. ERHARDT, T. LANDERS-DORFER, B. POPP, C. RINGEL, P. C. SCRIBA
Berechnung radioimmunologischer Meßwerte
mittels Spline-Funktionen
Ärztl. Lab. 20, 184 (1974)
41. MAURER, H. R.
Disc electrophoresis and related techniques
of polyacrylamide gel electrophoresis
De Gruyter Verlag, Berlin - New York 1971
42. MULDOON, T. G., U. WESTPHAL
Steroid-protein interactions XV.
Isolation and characterization of corti-
costeroid-binding globulin from human plasma
J. Biol. Chem. 242, 5636 (1967)
43. NIESCHLAG, E., E. J. WICKINGS
A review of radioimmunoassay for steroids
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 261 (1975)
44. PATERSON, J. Y. F.
The rate constants for the interaction of
cortisol and transcortin, and the rate of
dissociation of transcortin bound cortisol
in the liver
J. Endocr. 56/3, 551 (1973)
45. PEGG, P. J., P. M. KEANE
The simultaneous estimation of plasma cortisol
and transcortin binding characteristics by a
competitive protein binding technique
Steroids 14, 705 (1969)
46. PERRIN, F. M., M. G. FORREST
Time course of the effect of adrenalectomy
on transcortin binding characteristics
appraisal of different methods of calculation
Endocrinology 96/4, 869 (1975)
47. RACADOT, A., N. RACADOT-LEROY, M. DAUTREVAUX
Dosage de la transcortine sérique par électro
immunodiffusion (résultats préliminaires)
Lille Med. 19/2, 938 (1974)

48. ROSENTHAL, H. E., M. A. PAUL, A. A. SANDBERG
Transcortin a corticosteroid binding protein
of plasma XII.
Immunologic studies of transcortin in guinea
pig tissues
J. Steroid Biochem. 5/3, 219 (1974)
49. ROSNER, W.
Recent studies on the binding of cortisol
in serum
J. Steroid Biochem. 3, 531 (1972)
50. ROSNER, W.
The binding of steroid hormones in human serum
In: Jannieson, G. A. and T. J. Greenwalt (edts.)
Progress in Clinical and Biological Research
Elsevier, Amsterdam, Vol. 5, 1976, p. 377
51. ROSNER, W., H. L. BRADLOW
Purification of corticosteroid-binding globulin
from human plasma by affinity chromatography
J. Clin. Endocr. 33, 193 (1971)
52. ROSNER, W., P. C. BEERS, T. AWAN, M. S. KHAN
Identification of corticosteroid-binding
globulin in human milk: Measurement with
a filter disc assay
J. Clin. Endocr. Metab. 42, 1064 (1976)
53. ROSNER, W., R. DARMSTADT, S. J. TAUSTER
The kinetics of cortisol dissociation from
purified human corticosteroid-binding globulin:
Studies in a flowing system
J. Steroid Biochem. 4, 249 (1973)
54. ROSNER, W., R. A. DARMSTADT, S. TOPPEL
A simple precipitin test for corticosteroid-
binding globulin: Use in a search for the
absence of corticosteroid-binding globulin
in 10 000 subjects
J. Clin. Endocr. Metab. 37, 983 (1974)

55. ROSNER, W., R. HOCHBERG
Corticosteroid-binding globulin in the rat:
Isolation and studies on its influence on
cortisol action in vivo
Endocr. 91, 626 (1972)
56. SANDBERG, A. A., H. ROSENTHAL, S. L. SCHNEIDER et al.
Protein-steroid interactions and their role
in the transport and metabolism of steroids
In: Pincus, P., T. Nakao, J. F. Tait (eds.)
Steroid Dynamics. Proceedings of the symposium
on the dynamics of steroid hormones held in
Tokyo, Max 1965
New York, Academic Press, 1966
57. SANDBERG, A. A., W. R. SLAUNWHITE Jr., H. H.
ANTONIADES
The binding of steroids and steroid conjugates
to human plasma proteins
Rec. Progr. Hormone Res. 13, 209 (1957)
58. SANDBERG, A. A., M. WOODRUFF, H. ROSENTHAL et al.
Transcortin: A corticosteroid-binding protein
of plasma
XII. Half-life in normal and estrogen-treated
subjects
J. Clin. Invest. 43, 461 (1964)
59. SEAL, U. S., R. P. DOE
Corticosteroid-binding globulin,
I. Isolation from plasma of diethylstilbestrol-
treated men
J. Biol. Chem. 237, 3136 (1962)
60. SCHWARTZ, U., J. HAMMERSTEIN
A combined adsorption-gel filtration technique
for the determination of the cortisol-binding
capacity of transcortin
Z. Klin. Chem. Biochem. 13, 291 (1975)
61. SCRIBA, P. C., M. BAUER, D. EMMERT, G. G. HOFMANN,
K. HORN, C. R. PICKARDT
Thyroxine-binding globulin (TBG) levels in obese
patients diminished by total fasting (A)
XIth Acta Endocrinologica Congress 1977 No.120

62. SLAUNWHITE, W. R., A. A. SANDBERG
Transcortin: A corticosteroid-binding
protein of plasma
J. Clin. Invest. 38, 384 (1959)
63. SLAUNWHITE, W. R. Jr., S. SCHNEIDER, F. C. WISSLER,
A. A. SANDBERG
Transcortin: A corticosteroid-binding protein
of plasma
IX. Isolation and characterization
Biochemistry 5, 3527 (1966)
64. THIJSEN, J. H. H., E. VAN KAMMEN
Hormonal contraceptives and sex hormone
binding globulin capacity
J. Endocr. 64/3, 50 (1975)
65. TRAPP, G. A. U. S. SEAL, R. P. DOE
A ligand column for the purification of
steroid-binding proteins
Steroids, 18, 421 (1971)
66. VAN BAELEN, H., P. DE MOOR
Immunochemical quantitation of human trans-
cortin
J. Clin. Endocr. 39/1, 160 (1974)
67. VAN BAELEN, H., G. MANNAERTS
The role of sialic acid in determining the
survival of transcortin in the circulation
Arch. Biochem. 163/1, 53 (1974)
68. VAN KAMMEN, E., J. H. H. THIJSEN, F. SCHWARTZ
The influence of hormonal contraceptives on
sex hormone binding globulin (SHBG) capacity
Contraception (Los Altos, Cal.) 11/1, 53 (1975)
69. WERTHAMER, S., A. J. SAMUELS, L. AMARAL
Identification and partial purification of
'transcortin' like protein within human
lymphocytes
J. Biol. Chem. 248/18, 6398 (1973)

70. WESTPHAL, U.
Preparation and characteristics of corti-
costeroid-binding globulin (CBG, Transcortin)
Kardinska Symposia on Research Methods in
Reproductive Endocrinology, 1970
71. WESTPHAL, U.
Steroid-protein interactions
Monographs on Endocrinology. Springer-Verlag
Berlin-Heidelberg - New York, 1971
72. WILLIAMS, C. A., M. W. CHASE
The preparation of steroid-proteins conjugates
to elicit antihormonal antibodies
Methods in Immunology and Immunochemistry Vol.I
1967. Academic Press, New York - London
73. WONG, K. C., L. KORNEL, A. BEZKOROVAINY, B. E. P.
MURPHY
Isolation of cytoplasmic glucocorticoid
binding protein(s) from rat liver by means
of affinity chromatography, and its partial
characterization
Biochem. Biophys. Acta 328/1, 133 (1973)
74. ZAHLER, W. L.
Analytical polyacrylamid gel electrophoresis
and molecular weight determination
Methods in Enzymology

LEBENS LAUF

Am 27. 6. 1953 wurde ich in München geboren.
Meine Eltern sind der Abt.-Direktor Ernst Bernutz
und seine Ehefrau Hildegard geb. Ellward.

Von 1959 bis 1963 besuchte ich die Volksschule,
anschließend trat ich in das St.Anna-Gymnasium ein
und bestand 1972 das Abitur im Edith-Stein-Gymnasium.

Im Wintersemester 1972/73 begann ich das Medizin-
studium an der Ludwig-Maximilians-Universität in
München. 1974 legte ich die Ärztliche Vorprüfung
ab, 1975 den 1. Teil und 1977 den 2. Teil der Ärzt-
lichen Prüfung.

Im Januar 1976 begann ich bei Herrn Prof.Dr.med.
P. C. Scriba, Endokrinologische Abteilung der Me-
dizinischen Klinik Innenstadt der Universität
München unter besonderer Betreuung von Herrn P.D.
Dr.med.K. Horn mit den Untersuchungen zur vorlie-
genden Arbeit.

